



**REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL**  
**Ministério do Desenvolvimento, da Indústria e Comércio Exterior.**  
**Instituto Nacional da Propriedade Industrial**  
**Diretoria de Patentes**

---

**CÓPIA OFICIAL**

**PARA EFEITO DE REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE**

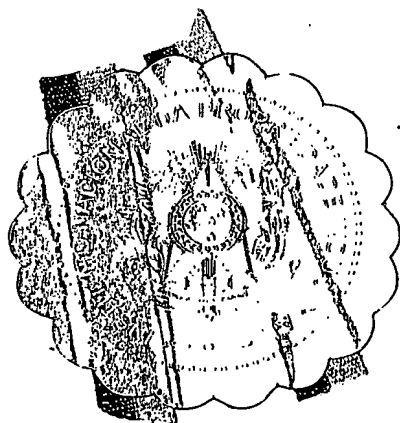
O documento anexo é a cópia fiel de um  
Pedido de Patente de Invenção  
Regularmente depositado no Instituto  
Nacional da Propriedade Industrial, sob  
Número PI 04056221 de 19/11/2004.

Rio de Janeiro, 24 de Janeiro de 2005.

*Murilo da Silva*

**Murilo da Silva**  
**Técnico 3 III Mat.449188**

**BEST AVAILABLE COPY**



10.01.834 = 805923

Protocolo

Número (21)

# **DEPÓSITO**

**Pedido de Patente ou de  
Certificado de Adição**



**PI0405622-1**

depósito / /

1 espaço reservado para etiqueta (número e data de depósito)

**Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:**

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

## **1. Depositante (71):**

1.1 Nome: PHB INDUSTRIAL S/A

1.2 Qualificação: Empresa Brasileira

1.3 CGC/CPF: 03.698.762/0001-00

1.4 Endereço completo: Usina da Pedra, s/nº - Bairro Zona Rural  
Serrana - SP

1.5 Telefone: ( )

FAX: ( )

☐ continua em folha anexa

## **2. Natureza:**

☒ 2.1 Invenção ☐ 2.1.1.. Certificado de Adição ☐ 2.2 Modelo de Utilidade

Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza desejada: **INVENÇÃO**

## **3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):**

"PROCESSO PARA RECUPERAÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) DE  
BIOMASSA CELULAR"

☐ continua em folha anexa

**4. Pedido de Divisão do pedido nº. \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.**

## **5. Prioridade Interna - O depositante reivindica a seguinte prioridade:**

Nº de depósito PI0306230-9 Data de Depósito 28 / 11 / 2003 (66)

## **6. Prioridade - o depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):**

País ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito

☐ continua em folha anexa

7. **Inventor (72):**  
( ) Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)  
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo nº 127/97)
- 7.1 Nome: PAULO EDUARDO MANTELATTO
- 7.2 Qualificação: brasileiro, engenheiro químico, CPF 044.108.658-62
- 7.3 Endereço: Rua São João, 1.344 - apto. 12  
Piracicaba - SP
- 7.4 CEP: 13486-890 7.5 Telefone ( )

☒ continua em folha anexa

8. **Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:**

2

☐ em anexo

9. **Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de graça):**  
(art. 12 da LPI e item 2 do Ato Normativo nº 127/97):

☐ em anexo.

10. **Procurador (74):**


- 10.1 Nome e CPF/CGC: Antonio Mauricio Pedras Arnaud  
Brasileiro, Casado, advogado, OAB/SP nº180.415
- 10.2 Endereço: Rua José Bonifácio, 93 - 7º, 8º e 9º andares - Centro  
São Paulo - SP
- 10.3 CEP: 01003-901 10.4 Telefone (011) 3291-2444

11. **Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):**  
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

X	11.1 Guia de recolhimento	1 fls.	X	11.5 Relatório descritivo	47 fls.
X	11.2 Procuração	1 fls.	X	11.6 Reivindicações	9 fls.
	11.3 Documentos de prioridade	fls.	X	11.7 Desenhos	1 fls.
	11.4 Doc. de contrato de Trabalho	fls.	X	11.8 Resumo	1 fls.
	11.9 Outros (especificar):				fls.
X	11.10 Total de folhas anexadas:				60 fls;

12. **Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras**

São Paulo, 19 de novembro de 2004

  
Antonio M. P. Arnaud / API 0320

Local e Data

Assinatura e Carimbo

ÁLVARO MINTO DUZZI

brasileiro, engenheiro químico, CPF 132.518.148-00

residente à Rua Vicente de Paula Lima, 382 - Centro - Serrana - SP

TETUHIKO SATO

brasileiro, engenheiro químico, CPF 037.979.458-68

residente à Rua Prof. Alexandre Correa, 321 - apto. 51 - Morumbi - São Paulo -SP

NAZARENO ANTÔNIO SERTÓRI DURÃO

brasileiro, engenheiro mecânico. CPF 047.188.628-92

residente à Rua Floriano Peixoto, 615 - apto. 01 - Centro - Brodowski - SP

ROBERTO VIANNA NONATO

brasileiro, químico, CPF 064.841.948-74

residente à Rua Coriolano, 982 - apto. 122 - São Paulo - SP

CARLO ROCCHICCIOLI

brasileiro, engenheiro químico, CPF 001.003.748-91

residente à Alameda Ministro Rocha Azevedo, 545 - apto. 81 - São Paulo - SP

SÔNIA MARIA KESSERLINGH

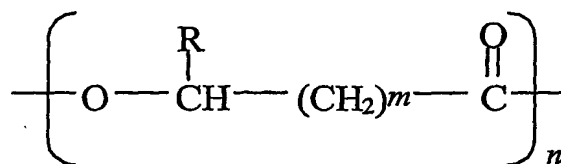
brasileira, engenheira química, CPF 128.587.988-00

residente à Rua Matheus Benelli, 494 - Jd. Recreio dos Bandeirantes - Sertãozinho - SP

como materiais descartáveis, como embalagens, frascos de cosméticos e agrotóxicos, até aplicações médicas e farmacêuticas.

Uma família importante dos biopolímeros biodegradáveis é a dos Polihidroxialcanoatos (PHAs), que são poliésteres naturalmente sintetizados por um grande número de seres vivos. Com mais de 170 representantes descritos na literatura, o interesse comercial pelos PHAs está diretamente relacionado não apenas à biodegradabilidade, mas também às suas propriedades termomecânicas e seus custos de produção. Desta forma, apenas alguns PHAs têm encontrado aplicação industrial, sendo os mais representativos o PHB (poli-3-hidroxibutirato), PHB-V (poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)), P4HB (poli-4-hidroxibutirato), P3HB4HB (poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato)) e alguns PHAmcl (polihidroxialcanoatos de cadeia média), sendo o representante típico desta última família o PHHx (polihidroxihexanoato).

A estrutura química dos PHAs pode ser descrita como uma cadeia polimérica, formada por repetições da seguinte unidade:



onde R é um grupo alquila ou alcenila de comprimento variável e m e n são números inteiros, sendo que, nos polímeros mencionados acima, R e m assumem os seguintes valores:

PHB: R=CH<sub>3</sub>, m=1

PHB-V: R=CH<sub>3</sub> ou CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-, m=1

P4HB: R=H, m=2

P3HB-4HB: R=H ou CH<sub>3</sub>, m=1 ou 2

PHHx: R=CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, m=1

A maioria dos PHAs pode ser processada em equipamentos de

extrusão e injeção convencionais, não necessitando de modificações significativas para uma boa processabilidade. É possível também processar estes polímeros em sistemas de "cast" e "coating film", para  
5 aplicações como materiais de embalagem para indústria alimentícia.

Em função do grau de desenvolvimento destes polímeros, é possível produzir embalagens para produtos de higiene pessoal de rápido descarte e baixa gramatura. Também,  
10 podem-se vislumbrar aplicações em frascos e embalagens para agrotóxicos, óleo para motores, descartáveis infantis, dentre outras. Ainda, onde a propriedade intrínseca de biodegradabilidade for requerida, os PHAs têm aplicação baseada em aspectos técnico-comerciais bem  
15 definidos, tais como: sacolas de compostagem, pinos de golfe, artigos de pesca e outros que estão diretamente ligados ao manuseio de materiais plásticos em campo aberto.

Na agroindústria, PHAs podem ser aplicados em vasos de  
20 plantas, tubetes para reflorestamento, filmes para estufagem e cobertura e, principalmente, em sistema de "liberação controlada" de nutrientes, fertilizantes, herbicidas e inseticidas.

Para aplicações biomédicas, os PHAs podem ser utilizados  
25 em microencapsulamento para liberação controlada de fármacos, suturas médicas e pinos de fixação para fraturas ósseas, em função de sua total biocompatibilidade e resposta muito suave do organismo receptor quanto à presença do corpo estranho. Ainda, com  
30 uma taxa de biodegradação *in vivo* muito lenta, mas contínua e completa, os PHAs apresentam ótimo potencial de aplicação como estrutura básica para próteses reabsorvíveis.

O grande desenvolvimento das ciências naturais nas duas  
35 últimas décadas, particularmente da biotecnologia, tem permitido, o uso dos mais diferentes organismos, naturais ou geneticamente modificados, na produção comercial de

PHAs. Particularmente relevante para a presente invenção é o uso de determinadas linhagens de bactérias, capazes de produzir e acumular em seu interior quantidades expressivas destes polímeros. Cultivadas em condições específicas, que permitem alcançar alta densidade celular, elevado teor de polímero intracelular e rendimentos compatíveis com o processo industrial, estas linhagens bacterianas podem utilizar diferentes matérias-primas renováveis, como açúcar de cana, melaço ou extratos celulósicos hidrolisados.

Embora tenham sido feitas tentativas de aplicação das células bacterianas *in natura* (sem a utilização de agentes solubilizadores de PHA), como material moldável, conforme descreve a patente US-3107172, as aplicações comerciais de PHAs, na grande maioria dos casos, requerem que sua pureza seja suficientemente elevada para atingir as propriedades plásticas desejadas. Atingir-se os níveis de pureza adequados ao processamento do biopolímero, em especial para os PHAs, normalmente implica em etapas em que a utilização de solventes para extração e recuperação do PHA da biomassa residual é indispensável.

Na patente EPA-01455233 A2 são descritas várias possibilidades para proceder a digestão de uma suspensão aquosa de células contendo PHA, utilizando-se enzimas e ou agentes surfactantes para solubilizar o material celular não PHA. Esta patente menciona como possíveis restrições aos processos que utilizam solvente o fato dos mesmos requererem grandes quantidades de solventes e daí possuírem elevados custos de produção. No entanto, menciona que a etapa solvente não é eliminada, se um produto de elevada pureza for o desejado. Além do mais, embora as enzimas utilizadas neste processo sejam adicionadas em quantidades relativamente baixas (1% em relação à matéria seca de células) estas possuem um custo bastante elevado, e não podem ser recuperadas no processo, contrariamente ao que ocorre quando se utiliza um solvente. Também, alta diluição do material celular é

requerida, o que leva a um grande volume de efluentes gerado no processo.

Os processos de extração comumente propostos consistem, basicamente, em expor a biomassa celular, contendo o biopolímero, seca ou úmida, em contato vigoroso com um solvente que o solubiliza, seguindo-se de uma etapa onde o resíduo celular é separado. A solução contendo o biopolímero recebe, então, a adição de um agente insolubilizante, que induz sua precipitação no solvente (ver por exemplo a patente brasileira PI 9103116-8, depositada em 16/07/91 e publicada em 24/02/93).

Nos processos de extração por solventes orgânicos, frequentemente citados na literatura para extração e recuperação de PHA de biomassa de bactérias, os solventes utilizados são hidrocarbonetos parcialmente halogenados, tais como o clorofórmio (patente US-3275610), cloreto de metileno/etanol (US-3044942), cloroetanos e cloropropanos com ponto de ebulição na faixa de 65 a 170°C, 1,2-dicloroetano e 1,2,3-tricloropropano (patentes EP-0014490 B 1 e EP 2446859).

Outros compostos, igualmente halogenados, como diclorometano, dicloroetano e dicloropropano são citados nas patentes americanas US-4.562.245 (1985), US-4.310.684 (1982), US-4.705.604 (1987) e a patente européia 036.699 (1981) e alemã 239.609 (1986).

Os processos de extração e purificação de biopolímero de biomassa que utilizam solventes halogenados, nos dias de hoje, são totalmente proibitivos, à medida que são altamente agressivos ao meio ambiente e à saúde humana. Um solvente, portanto, para ser candidato a ser utilizado como um potencial extrator do biopolímero de biomassa celular, deve atender, primeiramente, à condição de não ser agressivo ao meio ambiente.

Nesta direção, a patente brasileira, PI 9302312-0 (depositada em 1993 e concedida em 30/04/2002) apresenta um processo de extração de biopolímero de biomassa bacteriana, que utiliza, como solventes, álcoois de



cadeia superior a 3 carbonos ou os acetatos destes derivados. Esta patente dá preferência ao álcool isoamílico (3-metil-1-butanol), ao acetato de amila (ou o éster amil acético) e ao óleo fúsel, uma mistura de álcoois superiores obtida como subproduto da fermentação alcoólica e que tem por principal componente o álcool isoamílico. Esta patente se caracteriza, também, por utilizar um único solvente como extrator e purificador, não requerendo a utilização de um agente insolubilizante ou contra solvente e ou não solvente marginal. A precipitação do soluto (biopolímero) da solução de PHA é feita através do resfriamento da solução.

A patente americana US 6.043.063 (depositada em 14/04/1998 e pedido concedido em 28/03/2000), US 6.087.471 (depositada em 14/04/1998 e concedida em 11/06/2000) e o pedido de patente internacional WO-98/46783 (depositado em 15/04/1997) fazem menção a uma extensa lista de solventes não halogenados que poderiam ser potencialmente utilizados como solventes para extração de biopolímero de biomassa, mas que possuem em muito deles características como difícil manipulação industrial, toxicidade, além de elevado custo. Da extensa lista mencionada, que inclui também aqueles solventes citados na patente brasileira PI 9302312-0, há um número restrito de solventes com real potencial para utilização industrial na extração de biopolímero de biomassa vegetal ou de bactérias, quer por questões inerentes à incompatibilidade com biopolímero, quer pela toxicidade, explosividade, e até mesmo elevados custos. Também, a patente PI 96102256, depositada no Brasil em 16/08/1996 e publicada em 06/07/1999, é ainda menos seletiva, pois inclui até mesmo compostos bastante nocivos à saúde humana, além de óleos minerais e vegetais, gás carbônico (tecnologia de extração super crítica, de elevado custo) entre outros, como prováveis solventes candidatos a extrair biopolímero de biomassa vegetal e de bactérias. Ao mesmo tempo, esta patente contemporiza a necessidade

de evitar solventes potencialmente prejudiciais à saúde e ao meio ambiente.

Por serem os biopolímeros termosensíveis, ou seja, quando submetidos a temperaturas acima de um determinado valor se degradam irreversivelmente, perdendo peso molecular, o que poderá afetar definitivamente as propriedades que os caracterizam como termoplásticos, é fundamental ter em mente que a lista de solventes com potencial de serem utilizados industrialmente torna-se ainda mais restrita. Dependendo do solvente elegido para promover a extração do biopolímero, este terá potencial de utilização industrial muito aumentado se for associado a um processo adequado, que possibilite a extração do biopolímero sem promover alterações significativas em seu peso molecular. Acentuadamente, para os solventes que necessitam ser aquecidos acima de 70°C para solubilizar o biopolímero, quanto maior o tempo em que o mesmo ficar exposto a esta temperatura durante o processamento, maior será a degradação sofrida, fato que poderá comprometer irremediavelmente suas propriedades como termoplástico. Quanto menos alteração sofrer o PHA durante o processo de extração, tanto mais ampla será a gama de suas aplicações comerciais possíveis.

Conforme referenda a literatura, a cinética de degradação do biopolímero, especialmente PHA, obedece a uma reação de ordem zero (ver, por exemplo, tese de mestrado: Berger, E., 'Elaboration des techniques de separation pour des biopolymeres d'origine bacterienne: les acides poly-β-hydroxyalcanoiques', Departement de Genie Chimique-Ecole Polytechnique-Universite de Montreal, Canadá, 1990, páginas 72 a 75). Denotando-se a taxa de degradação de seu peso molecular com o tempo exposto a uma temperatura T como  $dMW/dt$ , a equação que define esta degradação é:

$$(d MW / dt)_{T_i} = k \quad (1)$$

onde:

k: é uma constante para um dado solvente a uma dada temperatura, T.

assim, se a equação (1) for integrada para um intervalo de tempo 0 a t, tem-se:

$$MW_T = k.t + MW_0 \quad (2)$$

onde:

5  $MW_T$  : é o peso molecular do biopolímero depois de decorrido o tempo de extração, t, para uma dada temperatura T; num solvente definido S;

10  $MW_0$ : é o peso molecular do biopolímero contido na biomassa, no tempo t=0, antes de ser submetido à extração;

k: é uma constante de proporcionalidade, para uma dada temperatura T e solvente S.

A título de exemplo, 20 g de biomassa de *Alcaligenes eutrophus* seca, contendo 70% de PHB, em base seca, são  
15 misturadas a 1500g de álcool isoamílico (grau técnico) a 110°C, submetendo-se a mistura a diferentes tempos de extração e filtração para remoção de partículas insolúveis de biomassa. A solução de PHB obtida é então resfriada rapidamente até 30°C para garantir a  
20 precipitação do PHB, que é em seguida filtrado e seco em corrente de ar a temperatura ambiente até a completa exaustão do solvente. Submetendo-se em seguida o PHB a avaliação de peso molecular pela técnica de GPC ('Gel Permeation Chromatography': Cromatografia de Permeação em  
25 Gel) resulta, após ajuste matemático por regressão linear, na seguinte equação de degradação:

$$MW_T = - 9753,81. t + 1.000.000, \quad R^2 = 0,98 \quad (3)$$

onde:

30  $MW_T$ : é o peso molecular do polihidroxibutirato após a extração em álcool isoamílico a 110°C, em Daltons;

t: é o tempo, em minutos, de exposição do polihidroxibutirato a temperatura de extração de 110°C em álcool isoamílico;

35 R: é o coeficiente de correlação dos pontos experimentais com a equação de ajuste.

Assim, da equação (3), tem-se que o polihidroxibutirato, contendo originalmente um peso molecular de 1.000,0000

74

Da, e submetido a uma extração em álcool isoamílico a 110°C, daria, para um tempo de 5 minutos, um peso molecular de 951.230 Da, para 15 minutos de exposição 853.692Da, para 30 minutos de exposição 707.410 Da, para 60 minutos 414.771 Da. e 90 minutos 122.230 Da.

Considerando-se que, além da extração, outras operações, como evaporação do solvente e secagem, são necessárias à obtenção de um produto puro com boas propriedades mecânicas, e que estas operações muitas vezes expõem o biopolímero a situações críticas para o material, não é difícil de imaginar as dificuldades inerentes ao processamento deste tipo de material. Além do solvente, deve se ter um processo adequado a não degradação térmica do produto.

Desta forma, a título de exemplificação, os solventes mencionados na patentes US-6.043.063 e suas respectivas temperaturas de extração de PHA em graus Celsius, entre parênteses, são apresentados na lista abaixo: butirato de etila (120°C), propionato de propila (118°C), acetato de butila (120°C), propionato de butila (123°C), acetato tetrahidrofurfurílico (121°C), propionato de metila (75°C), normal-valerato de metila (115°C), 1-butanol (116°C), 2-metil-1-butanol (117°C), 3-metil-1-butanol (125°C e 126°C), 1-pentanol (125°C e 126°C), 3-pentanol (115°C), álcool amílico (128°C), 1-hexanol (134°C), etil diacetato glicol (137°C), álcool tetrahidrofurfurílico (117°C), metil-amil-cetona (120°C), meti-isobutil-cetona (115°C), acetofenona (110°C), 1,2-diaminopropano (115°C), alfa-metil-estireno (126°C), dimetil sulfóxido (117°C), propileno carbonato (110°C), 1,2,3-trimetil-benzeno (121°C), dimetilacetamina (90°C) e dimetil-formamida (90°C). Estes solventes só terão potencial de utilização industrial, se associados a eles houverem processos eficazes no que tange à baixa exposição do biopolímero à degradação térmica. No entanto, nenhuma menção é feita às propriedades dos materiais obtidos, especialmente as referentes ao peso molecular do produto.

Outro fato relevante à viabilização industrial desta via de extração de PHA, é que, por se tratar de um processo intensivo em energia, deve se ter em mente que a viabilidade do produto também estará intimamente ligada à disponibilidade de fonte renovável de energia de baixo custo.

Considerando todos os fatores anteriormente abordados, de uma maneira geral as propriedades de biodegradabilidade e sustentabilidade dos PHAs, embora possam justificar preços mais elevados que os polímeros tradicionais da indústria petroquímica, a disposição dos mercados em assimilar estes preços é bastante limitada (Braunegg G, Lefebvre G, Genser FK (1998) Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. J. Biotech. 65: 127-161).

Desta forma, processos industriais de produção de PHAs devem contemplar: linhagens de microorganismos altamente eficientes na conversão da matéria-prima em polímero, com protocolo de produção simples e eficiente; matérias-primas de baixo custo e com alto aproveitamento; procedimento de extração e purificação do polímero que permita a obtenção de um produto de elevada pureza, preservando ao máximo as características originais do biopolímero, com alto rendimento e eficiência e através de processos não agressivos ao meio ambiente.

Além destes aspectos econômicos, em se tratando de um produto ambientalmente mais amigável, todo seu processo de produção também o deve ser. Portanto, a utilização de produtos danosos ao ambiente em qualquer etapa da produção deve ser evitada. Ainda, a fonte de energia utilizada para rodar o processo de produção deve vir de fonte renovável. Não faria sentido produzir-se um plástico de baixo impacto ambiental se, em sua produção, forem utilizadas unicamente fontes de energia não renováveis, por exemplo. Uma abordagem bastante interessante para este problema é a incorporação de toda a cadeia produtiva do bioplástico pela agroindústria, em

particular pela indústria sucro-alcooleira (Nonato, R.V., Mantelatto, P.E., Rossell, C.E.V., "Integrated Production of Biodegradable Plastic (PHB), Sugar and Ethanol", Appl. Microbiol. Biotechnol. 57:1-5, 2001).

5 Representando um dos maiores sucessos mundiais na  
produção de combustíveis alternativos, a indústria sucro-  
alcooleira no Brasil é responsável por cerca de 25% de  
10 todo o álcool e açúcar produzidos no planeta. Apesar de  
ter apresentado uma imagem ambientalmente negativa no  
início do programa brasileiro do Proálcool, este tipo de  
indústria é na realidade um exemplo de tecnologia  
sustentável. Toda a energia necessária para rodar o  
15 processo de produção é gerada in loco, queimando-se em  
caldeiras o bagaço da cana para produção de energia  
térmica e elétrica. Existe ainda um excedente de energia,  
que pode ser utilizado em outros processos industriais  
incorporados.

Energia renovável e barata, aliada à disponibilidade de  
matérias-primas de custo reduzido - açúcar e melaço - e  
20 solventes naturais, obtidos como subprodutos da  
fermentação alcoólica, torna a indústria sucro-alcooleira  
o berço ideal para a produção de bioplástico.

Por conseguinte, a presente invenção reúne todas as  
características acima relacionadas, necessárias à  
25 viabilização de um processo industrial para recuperação  
de polihidroxialcanoatos (PHA's), preferivelmente a partir  
de biomassa úmida de bactérias, utilizando solventes não  
halogenados e não agressivos ao meio ambiente, gerando um  
produto de elevada pureza e peso molecular, utilizando  
30 fontes de matérias-primas e energia renováveis oriundas  
da indústria sucro-alcooleira da cana-de-açúcar.

#### Sumário da invenção

A invenção objeto desta patente está relacionada a um  
processo, já comprovado industrialmente, para extração e  
35 recuperação de polihidroxialcanoatos (PHA's), a partir de  
biomassa celular de bactérias, obtida por fermentação e  
na forma de um lodo de biomassa celular em suspensão

17

18  
aquosa e com um teor de matéria celular seca não inferior a cerca de 18% em peso, da suspensão. Em uma possível forma de realização da invenção, o lodo de biomassa celular concentrado é obtido submetendo-se a biomassa  
5 celular, em suspensão no meio de cultura fermentado, a operações de floculação e concentração das células de biomassa.

De acordo com o processo, o lodo de biomassa celular concentrado é inicialmente submetido a uma etapa de  
10 extração de PHA que compreende operações concomitantes de injeção de solvente de PHA, de agitação vigorosa e de aquecimento rápido no interior de um reator, de modo a formar uma suspensão compreendendo solvente de PHA enriquecido com PHA dissolvido, água remanescente do lodo  
15 de biomassa celular e resíduos insolúveis da biomassa celular concentrada.

A suspensão formada no reator é então submetida a uma separação para recuperação do solvente, enriquecido com o PHA dissolvido, dos resíduos insolúveis da biomassa  
20 remanescentes.

Em seguida a solução de solvente de PHA enriquecida com PHA é rapidamente resfriada para uma temperatura suficiente para precipitar substancialmente todo o PHA dissolvido.

25 O processo em questão compreende ainda as etapas de: micro-filtrar, a frio, a suspensão de PHA precipitado no solvente de PHA contendo água e impurezas nele dissolvidas, de modo a separar uma pasta concentrada de PHA precipitado; submeter à pasta de PHA concentrada a  
30 operações simultâneas de lavagem com água, aquecimento e agitação de modo a promover a evaporação de parte de uma certa quantidade de solvente, adequada para a obtenção de uma suspensão contendo grânulos de PHA dotados de alta porosidade, frágeis e facilmente cisalháveis, o solvente remanescente e água;  
35 submeter os grânulos de PHA, lavados e aquecidos, a agitação e cisalhamento, para rompê-los rapidamente, enquanto se processa o esgotamento

do solvente residual através da injeção de vapor d'água na suspensão contendo o solvente remanescente e água, de modo a obter partículas de PHA purificadas na suspensão; e separar as partículas de PHA purificadas da suspensão.

- 5 Dos PHAs encontrados, com aplicação industrial, aqueles aqui utilizados podem ser definidos por poli-3-hidroxi-butirato (PHB), poli(hidroxi-butirato-co-hidroxi-valerato) PHBV, e misturas desses polímeros e copolímeros.

10 Breve descrição dos desenhos

A invenção será a seguir descrita, fazendo-se referência ao desenho anexo, dado a título de exemplo de uma possível forma de realização da invenção e cuja figura 1, única, representa um fluxograma simplificado do referido

15 processo.

Descrição detalhada da invenção

Descreve-se a seguir uma lista de definições de termos utilizados na descrição da presente invenção:

- 20 - "Alcenila" significa uma cadeia carbônica insaturada, de  $C_1$  a  $C_n$ , onde  $n$  varia de 2 a cerca de 20, podendo essa cadeia carbônica ser linear, ramificada ou cíclica e a insaturação ser monoinsaturada, ou seja, com uma dupla ou uma tripla ligação na cadeia carbônica; ou polinsaturada, isto é, com duas ou mais duplas ligações,
- 25 ou com duas, ou mais triplas ligações, ou ainda com uma ou mais duplas ligações e uma ou mais triplas ligações na cadeia carbônica.

- "Alquila" significa uma cadeia carbônica saturada, de  $C_1$  a  $C_n$ , onde  $n$  varia de 2 a cerca de 20, podendo essa
- 30 cadeia carbônica ser reta, ramificada ou cíclica.

- "Biomassa Celular" significa uma biomassa proveniente de qualquer microorganismo ou planta que produza PHA, naturalmente ou mediante modificação genética para torná-la produtora de PHA ou para torná-la mais produtora de
- 35 PHA.

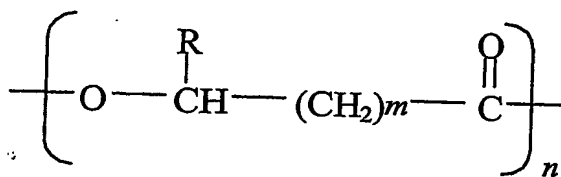
- "Compreende" ou "Compreender" significa que outros passos, ou outras etapas, ou outros compostos, ou outros

19



ingredientes que não afetam o resultado final podem ser adicionados ou estar presentes. Esse termo pode também ser substituído por, ou substituir os termos: "constituído de" "constituído por", "constituído essencialmente de" e "constituído essencialmente por".

- 5 - "Da" significa Dalton, unidade de medida de peso molecular de polímeros.
- 10 - "Extraíir polihidroxialcanoatos de uma biomassa" ou "Extração de polihidroxialcanoatos de uma biomassa" significa extrair ou a extração de um determinado PHA produzido por uma biomassa produtora de um único tipo de PHA, e adicionalmente pode também significar extrair ou a extração de mais de um tipo de PHA produzido por uma biomassa, para situações onde a biomassa produtora de
- 15 PHA, produza mais que um único tipo de PHA.
- 20 - "Extrato Bruto" significa a suspensão constituída pelo solvente de PHA enriquecido com o PHA extraído da massa de células de PHA, contendo nele dissolvidas água e impurezas extraídas da massa celular, e pelos sólidos insolúveis que é o resíduo da biomassa celular, da qual que o PHA foi extraído.
- "Polihidroxialcanoatos" e "PHA" significa um polímero que engloba a seguinte unidade de repetição:



25 onde R é preferencialmente o H ou o radical alquila ou o radical alcenila e m varia de 1 a 4.

- "Pressão substancialmente atmosférica" significa uma pressão muito próxima à atmosférica, isto é igual ligeiramente superior ou inferior à pressão atmosférica.
- 30 - "Reator de Extração" significa o equipamento no qual se processa a operação de extração do PHA da biomassa celular produtora de PHA.
- "Resfriar rapidamente" uma corrente (solução ou

suspensão) significa: resfriar essa corrente (solução ou suspensão) em alguns segundos, por expansão, por troca térmica com outra corrente mais fria e/ou por resfriamento por meio de trocadores de calor.

- 5 - "Solvente" significa uma substância capaz de dissolver outra substância denominada soluto, de modo a formar uma mistura, denominada solução, de um soluto uniformemente disperso no solvente, ao nível de dimensão molecular ou ao nível de dimensão iônica.
- 10 - "Solvente de PHA" significa uma substância capaz de dissolver polihidroxialcanoatos.
- "Solvente de PHA enriquecido" ou "solução de solvente de PHA enriquecida" significa uma solução de solvente de PHA contendo o PHA extraído da biomassa celular produtora de PHA.
- 15 - "Virtualmente isento de" ou "praticamente isento de" significa "ter muito pouca quantidade de" ou "ter presença de traços de" ou "ter uma quantidade não significativa de" ou "ter uma quantidade quase imperceptível de".
- 20

A invenção objeto desta patente está relacionada, a um processo, já comprovado industrialmente, para extração e recuperação de polihidroxialcanoatos (PHAs), preferivelmente, a partir de biomassa úmida (diluída em

25 água) de microorganismos, utilizando solventes não halogenados e não agressivos ao meio ambiente, permitindo a obtenção de polihidroxialcanoatos (PHAs) de elevada pureza e peso molecular, utilizando fontes de matérias-primas e energia renováveis, oriundas da indústria sucro-alcooleira da cana-de-açúcar.

30

Há um número relativamente grande de publicações descrevendo a extração de PHA por solventes não halogenados de fontes de biomassa de microorganismo ou vegetal. No entanto, quando se busca aplicar em escala

35 comercial os ensinamentos descritos, denota-se uma grande dificuldade em se obter um produto com as propriedades originais do biopolímero intracelular preservadas,

características estas, na maioria das vezes, fundamentais a elaboração de produtos comerciais. O que se observa é que, na maioria destas publicações, pouca atenção é dada a termosensibilidade do produto a elevadas temperaturas.

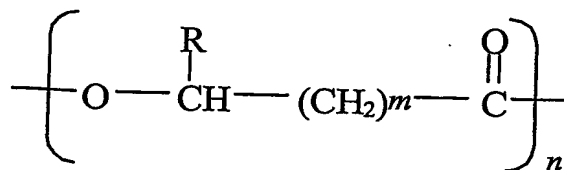
5 A maioria dos solventes não halogenados, mencionados como candidatos à extração de PHA, apresentam baixa solubilidade para este soluto e requerem temperaturas elevadas, normalmente acima de 70°C, para sua extração e recuperação. Quando se busca processar a extração de PHA  
10 com tais solventes, em escala comercial, os tempos necessários à recuperação de PHA muitas vezes se tornam longos demais, o bastante para degradá-lo termicamente de maneira irreversível. O produto assim obtido, dependendo do tempo de exposição à temperatura elevada, torna-se  
15 restrito a um número muito limitado de aplicações na indústria, ou até mesmo a mais nenhuma aplicação.

A presente invenção reporta um processo em escala industrial, onde as etapas de processamento são combinadas de maneira tal a permitir: a) minimizar o  
20 tempo de exposição da maior parte do PHA extraído da biomassa celular a temperaturas elevadas, utilizando solventes não halogenados, possibilitando minimizar sua degradação, de maneira a preservar o máximo possível suas propriedades originais, especialmente seu peso molecular;  
25 b) obtenção de um produto de elevada pureza, normalmente superior a 99%, preservando a cor natural do biopolímero, e virtual ausência de solvente residual, sem a necessidade de inclusão no processo de etapas adicionais específicas para remoção de cor e de purificação do PHA produzido; c) obter um elevado nível de recuperação do  
30 PHA de biomassa, normalmente superiores a 90%; d) utilizar, de maneira integrada, fontes renováveis de matérias-primas e energia oriundas da indústria sucro-alcooleira, permitindo aumentar a rentabilidade dos  
35 complexos industriais produtores de açúcar e álcool.

Os métodos da presente invenção são aplicáveis a PHAs produzidos por microorganismos ou plantas de ocorrência

22

natural ou geneticamente modificados, ou PHAs sinteticamente produzidos. PHA é um polímero constituído por repetições da seguinte unidade:



- 5 onde R é um grupo alquila ou alcenila de comprimento variável e m e n são números inteiros, sendo que, nos polímeros mencionados acima, R e m assumem os seguintes valores:

PHB: R=CH<sub>3</sub>, m=1

- 10 PHB-V: R=CH<sub>3</sub> ou CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-, m=1

P4HB: R=H, m=2

P3HB-4HB: R=H ou CH<sub>3</sub>, m=1 ou 2

PHHx: R=CH<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, m=1

- 15 Esta invenção é aplicável a PHAs recuperados de biomassa de microorganismos, preferivelmente a PHB (poli-3-hidroxibutirato), PHB-V (poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato)), P4HB (poli-4-hidroxibutirato), P3HB4HB (poli(3-hidroxibutirato-co-4-hidroxibutirato)) e alguns PHAmcl (polihidroxialcanoatos de cadeia média), sendo o  
20 representante típico desta última família o PHHx (polihidroxihexanoato).

Processo de extração de PHAs utilizando solventes não halogenados, com baixo tempo de exposição do biopolímero a uma condição de degradação térmica.

- 25 A presente invenção diz respeito a um processo, ilustrado na figura 1, que utiliza um fermentado de biomassa celular de bactérias obtida por fermentação e na forma de um lodo de biomassa celular em suspensão aquosa e com um teor de matéria celular seca não inferior à cerca de 18%  
30 em peso.

De acordo com a presente invenção, o lodo concentrado

23

formado a partir da biomassa celular, pode ser obtido diretamente de uma fermentação que alcance a concentração mínima necessária de matéria seca ou submetendo-se a biomassa celular em suspensão no meio de cultura fermentado a operações de floculação e concentração das células da biomassa.

Em uma forma preferida da invenção, a biomassa celular em suspensão aquosa, a ser disponibilizada ao processo, pode ser ainda diluída em água, para apresentar uma proporção mássica de água:fermentado de até cerca de 3,0:1,0.

Em uma outra forma de realização da invenção, a biomassa celular de bactérias, obtida por fermentação, a ser processada, pode ser previamente inativada termicamente.

Em uma outra forma preferida de realização da invenção, a operação de floculação compreende uma etapa de coagulação da biomassa celular realizada por meio da acidificação da biomassa celular diluída, para um pH de cerca de 1,5 a cerca de 5,5 e da adição de um agente alcalinizante até ser alcançado um pH de cerca de 7 a cerca de 12; sendo a operação de floculação das células de biomassa, contendo PHA acumulado, realizada por meio da adição de um agente floculante. A acidificação da biomassa celular diluída pode ser obtida através da adição de um ácido definido por pelo menos um dos ácidos sulfúrico e fosfórico. O agente alcalinizante, pode compreender hidróxido de cálcio.

Em uma outra forma de realização da invenção, a acidificação da biomassa celular diluída é feita de modo a ser obtido um pH de cerca de 2,0 a cerca de 3,0, e a adição do agente alcalinizante é feita de modo a ajustar o pH da suspensão de biomassa celular diluída, para cerca de 7 a cerca de 12.

A adição seqüencial dos referidos elementos, na etapa de floculação, permite a formação de fosfatos de cálcio que formam pontes com as paredes das células de microorganismos contendo o PHA, com carga resultante positiva e que são agregadas num floco através do agente

24

floculante , levando à formação de um floco estável e com densidade superior a do líquido que o envolve.

Deve ser entendido que a etapa de coagulação da biomassa celular de bactérias em suspensão no meio de cultura fermentado, pode ser também realizada por meio da adição apenas do agente alcalinizante, até ser alcançado um pH de 7 a cerca de 12, sendo a floculação da biomassa celular, contendo PHA acumulado, realizada por meio da adição do agente floculante, conforme acima mencionado.

Os flocos formados, contendo as células com PHA acumulado, são então facilmente separados do meio de cultura fermentado líquido envolvente, contendo as impurezas oriundas da fermentação, pela ação da força da gravidade, utilizando, por exemplo, decantadores estáticos ou através da força centrífuga, fazendo-se uso, por exemplo neste caso, de centrífugas ou "decanter". Optando-se por centrífugas ou decanter, o clarificado efluente dos mesmos pode ser novamente tratado com ácido e base, floculado, submetido à decantação e o lodo concentrado obtido, enviado à etapa posterior juntamente com a outra parcela obtida nas centrífugas ou decanter. O processo permite, portanto, nas formas preferidas da invenção em que haja floculação da biomassa, promover a remoção parcial das impurezas extracelulares dissolvidas no meio de cultura fermentado, através da separação deste dos flocos, removendo principalmente os elementos coloridos e demais sais solúveis prejudiciais às etapas posteriores de processamento.

Permite ainda a formação de um lodo concentrado de biomassa, contendo flocos estáveis e com densidade aumentada em relação à do líquido que os envolve.

Em outra forma preferida da invenção, a biomassa celular floculada é submetida a um processo de concentração e lavagem, resultando num lodo de biomassa concentrado na faixa de 18 a 45 % (peso/peso), mais preferivelmente 25 a 45%.

A biomassa celular concentrada é então submetida a

25

extração do PHA intracelular, mediante injeção de solvente de PHA preferencialmente na forma líquida, aquecido, e na forma de vapor, sob agitação vigorosa em um reator, de modo a provocar, rapidamente, o aquecimento da biomassa celular para uma temperatura entre cerca de 90°C até a temperatura de ebulição do solvente, à pressão substancialmente atmosférica, e a formar: uma fase líquida compreendendo solvente de PHA enriquecido com PHA e água remanescente do lodo de biomassa celular; uma fase sólida definida pelos resíduos insolúveis da biomassa celular residual; e uma fase vapor contendo vapores de água e de solvente PHA. Os vapores de água e de solvente de PHA, gerados nas várias etapas do processo, são condensados e separados em duas fases líquidas: uma rica em solvente que retorna ao processo na fase de extração e recuperação de PHA; e uma outra pobre em solvente que é recirculada no processo para possibilitar a recuperação do solvente de PHA nela contido.

Este procedimento, além de aquecer a biomassa celular, promove também o efeito de remover a maior parte da água alimentada com o lodo na forma de um vapor que é uma mistura binária constituída de solvente de PHA e água. A fase vapor pode ser então extraída do reator para ser posteriormente condensada, deixando para trás uma suspensão constituída de uma solução de solvente de PHA enriquecido em PHA e uma pequena fração de água dissolvida no solvente, além de resíduos insolúveis da biomassa celular extraída.

Desta forma, a título de exemplos, os solventes de PHA utilizados podem ser selecionados do grupo de solventes constituído por: acetato de butila, acetato de isobutila, acetato de amila, acetato de isoamila, álcool isobutílico, 1-butanol, 1-pentanol (álcool amílico), 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico), 3-pentanol, 1-hexanol, ciclohexanol, propionato de propila, propionato de butila, propionato de isobutila, butirato de etila, isobutirato de isobutila, e misturas

26

desses solventes. Preferivelmente, o solvente utilizado pode ser o álcool isoamílico, ou misturas isoméricas de álcool isoamílico, e mais preferivelmente, o álcool isoamílico ser obtido do fracionamento do óleo fúsel, subproduto da fermentação etanólica, sendo o óleo fúsel composto primordialmente pelo álcool isoamílico e seus isômeros, além de impurezas como: etanol, n-propanol, isobutanol, n-butanol e água.

O contato entre o solvente extrator e a biomassa celular de PHA é promovido em condições controladas e por sistema de agitação dimensionado para permitir contato vigoroso entre as partes, e garantir um resíduo de biomassa celular insolúvel com tamanho uniforme de partículas, o que facilita as operações posteriores.

Conforme ilustrado na figura 1, a corrente então obtida, aqui denominada F, constituída pela suspensão contendo PHA e água, dissolvidos no solvente e resíduos de biomassa celular insolúveis, numa forma preferida da invenção, é então alimentada em um elemento separador centrífugo, por exemplo um hidrociclone, onde a aplicação de uma força centrífuga de baixa intensidade (algumas vezes a força gravitacional), leva à geração de duas correntes: uma corrente constituída de uma suspensão com baixa concentração de sólidos insolúveis residuais de biomassa em uma solução contendo PHA e pequena fração de água dissolvidos no solvente de PHA, aqui denominada corrente O, e outra contendo uma suspensão concentrada em resíduos de biomassa insolúvel em uma solução contendo PHA e pequena fração de água dissolvida, denominada aqui de corrente U. A separação das duas correntes efluentes do elemento separador centrífugo é feita de modo que a corrente U seja de cerca de 15 a 35% (peso/peso) da corrente F, e contenha cerca de 55 a 75% (peso/peso) dos sólidos originalmente presentes na corrente F e contendo ainda uma fração de PHA intracelular a ser recuperada. A separação destas duas correntes, como aqui descrita, efetuada sob efeito de uma força centrífuga de baixa

27



intensidade, em equipamentos estáticos, robustos e de baixo custo, como é o caso por exemplo da utilização de hidrociclones, dispensa portanto a utilização de centrífugas mecânicas de alto custo, e que requereriam a  
5 utilização de atmosferas de gás inerte, dados os limites de explosividade e inflamabilidade dos solventes de PHA. Esta separação é aqui assegurada pela maior densidade das partículas de sólidos insolúveis residuais em relação ao  
10 solvente que as envolve, conferida pela coagulação inicial, onde partículas pesadas, como as de fosfatos de cálcio, ligaram-se às células contendo PHA intracelular e constituintes da biomassa celular. Outro efeito importante é a capacidade do sistema extrator em obter partículas com uma distribuição granulométrica uniforme  
15 durante a extração, o que assegura uma alta eficiência de separação e concentração dos sólidos contendo PHA intracelular não extraído, mediante a utilização de um elemento separador centrífugo de baixa intensidade. Opcionalmente a corrente O pode ser submetida a um  
20 processo de microfiltração por membrana onde são geradas duas correntes: uma corrente P, permeada através da membrana, e uma corrente C, de concentrado da membrana. A corrente P, que é de cerca de 50% a 90% (peso/peso) da corrente O, é isenta de sólidos insolúveis e contém PHA, água e pequenas frações de cinzas e compostos coloridos  
25 dissolvidos no solvente de PHA, sendo imediatamente resfriada à temperatura de cerca de 45°C ou inferior. A corrente C, que é cerca de 10 a 50% da corrente O, é concentrada em relação à concentração de sólidos residuais de biomassa extraída em cerca de 2 a 10 vezes o  
30 conteúdo original destes sólidos na corrente O e contém ainda uma fração de PHA, água, cinzas e compostos coloridos dissolvidos no solvente de PHA. Opcionalmente a corrente U e a corrente C, concentradas  
35 em resíduos insolúveis de biomassa extraída e empobrecidas em PHA, podem ser juntadas e enviadas a um processo de recuperação do PHA remanescente dissolvido no

28

solvente de PHA, por um processo de separação, por exemplo por filtração, onde é gerada uma corrente filtrada, denominada FI; contendo PHA, água, cinzas, compostos coloridos, dissolvidas no solvente de PHA, e  
5 uma torta final, aqui denominada T, contendo os sólidos insolúveis residuais da biomassa extraída.

Opcionalmente a corrente U, a corrente C e uma nova quantidade de solvente de PHA, na forma líquida e na forma vapor, podem ser novamente misturadas, em condições  
10 adequadas de agitação, compondo então uma nova corrente, e novamente submetida ao processo anteriormente descrito. Desta forma o efluente final, então resultante, concentrado em resíduos insolúveis de biomassa celular extraída e empobrecido em PHA, é finalmente submetido a  
15 um processo de recuperação do PHA remanescente, dissolvido no solvente de PHA, por um processo de separação, por exemplo por filtração. O processo de extração descrito compreende um número de estágios tal, que torna possível a recuperação de quantidades  
20 superiores a cerca de 95% (peso/peso) do PHA originalmente contido na biomassa, com tempos de retenção inferiores a cerca de 10 a 20 minutos, de modo a obter PHA com peso molecular de, no mínimo cerca de 850.000 Da, partindo-se de um lodo de biomassa contendo PHA com peso  
25 molecular no mínimo de cerca de 1.000.000 Da.

Opcionalmente, ainda, a corrente O que contém os sólidos insolúveis remanescentes do processo efetuado no elemento separador centrífugo (por exemplo um hidrociclone), pode ser enviada para um processo de  
30 separação dos sólidos insolúveis, sem passar por processo de microfiltração por membrana, obtendo-se desta forma uma corrente de filtrado, contendo PHA dissolvido no solvente e isenta de qualquer sólido insolúvel da biomassa e deixando para trás uma torta contendo tais  
35 impurezas insolúveis. O PHA recuperado desta forma possui peso molecular ligeiramente menor que o obtido por microfiltração por membrana.

Na forma da preferida da invenção, a corrente de extrato bruto F, contendo os resíduos insolúveis de biomassa extraída, é enviada diretamente ao processo de recuperação do PHA dissolvido no solvente de PHA, sem  
5 passar pelo elemento separador centrífugo e pela microfiltração em membrana; apresentando o PHA neste caso qualidade parecida à opção anterior, porém possuindo um peso molecular ligeiramente diminuído em relação à mesma, pelo incremento no tempo de retenção do polímero  
10 decorrente do processo de separação dos sólidos insolúveis.

A corrente P e a corrente FI, acima descritas, isentas de resíduos insolúveis de biomassa celular e contendo PHA, água, cinzas e alguns compostos coloridos, dissolvidos no  
15 solvente de PHA, ao serem rapidamente resfriadas a temperaturas em torno de 45°C ou inferiores a esta, provocam a precipitação de PHA formando uma suspensão, cujo peso molecular é no mínimo de cerca de 750.000 Da, partindo-se de um lodo de biomassa contendo PHA com peso  
20 molecular no mínimo de cerca de 1.000.000 Da. Esta precipitação pode ainda ser auxiliada pela introdução de um germen de cristalização.

A suspensão de PHA em solvente de PHA, obtida através da precipitação por resfriamento, contendo nesta dissolvidos  
25 água, cinzas e compostos coloridos dissolvidos, é então submetida a um processo de separação, preferivelmente por membranas poliméricas microporosas. Este processo permite a obtenção de uma corrente de permeado PE, que é de cerca de 60% a 90% do fluxo mássico alimentado na membrana, constituída por solvente de PHA, água, cinzas solúveis e  
30 compostos coloridos dissolvidos no solvente de PHA e virtualmente isenta de PHA; e, uma outra corrente, de cerca de 40% a 10% da corrente alimentada, que é constituída de uma suspensão concentrada de PHA e uma  
35 fração de cinzas e compostos coloridos dissolvidos no solvente de PHA. Esta etapa, da maneira como descrita nesta invenção, além de permitir concentrar a suspensão

de PHA até uma concentração de cerca de 3,5% a 8% (peso/peso), em condições altamente favoráveis à preservação do peso molecular do PHA, num processo à temperatura próxima à ambiente e pela via física (membranas), esta etapa leva ainda à eliminação simultânea, através do permeado, de cerca de 70% a 90% das impurezas dissolvidas, até então constituintes da suspensão de PHA.

A suspensão previamente concentrada de PHA, com uma concentração de PHA variável entre cerca de 3,5% a 8% (peso/peso), e definida pela corrente S na figura 1, é então submetida a uma etapa de concentração por evaporação, à pressão atmosférica, e preferencialmente em múltiplos efeitos a vácuo, nos quais são alimentados simultaneamente, a suspensão de PHA e uma corrente de água fraca AF, recuperada no processo, contendo solvente de PHA nela dissolvido. Esta água fraca é alimentada nos evaporadores numa proporção tal que permita se obter uma suspensão contendo basicamente PHA, solvente de PHA e água, formando aglomerados de grânulos de PHA, dotados de alta porosidade, fragilmente aglomerados e facilmente cisalháveis. Esta suspensão é então, simultaneamente com a evaporação, submetida a um processo de cominuição em um elemento de cisalhamento mecânico, por exemplo por uma bomba centrífuga de circulação, onde os aglomerados de grânulos de PHA, com alta porosidade e frágeis, são rápida e adequadamente rompidos, de modo a obter uma suspensão de partículas de PHA, muito mais finas, que podem ser abundantemente lavadas durante o processo de evaporação do solvente de PHA. Esta suspensão, à qual é adicionada uma corrente de água fraca (AF1), é então submetida à evaporação do solvente residual final, "stripping", até seu esgotamento no líquido remanescente (licor mãe), mediante a injeção de vapor vivo, simultaneamente com recirculação da suspensão obtida na etapa anterior. Através da repetição do processo de cisalhamento, durante a evaporação, é possível se obter

31

uma cominuição controlada do PHA até torná-lo um pó em suspensão no líquido remanescente livre de solvente. Terminado o processo, obtém-se, portanto, uma suspensão de partículas de PHA finamente dispersa no líquido remanescente (licor mãe), que por sua vez contém, dissolvidas, as impurezas removidas do PHA. Esta suspensão é então resfriada rapidamente até cerca de 45°C ou menos e submetida a um processo de separação do sólido do líquido, por exemplo por filtração e enxágue do bolo filtrado com água limpa, contendo as partículas de PHA. Estas etapas finais de evaporação, "stripping", resfriamento, e filtração permitem, portanto, ao mesmo tempo em que se efetua a evaporação, que se efetue o esgotamento do solvente de PHA do meio e a purificação final das partículas de PHA, sem danos ao peso molecular do PHA. Além disso, propicia a obtenção de partículas com uma distribuição granulométrica adequadas ao processo de secagem, na faixa de cerca de 40 a 400  $\mu\text{m}$  e preferencialmente de cerca de 100 a 200  $\mu\text{m}$ , de modo a permitir a utilização de condições brandas de secagem, isto é, com o PHA submetido a temperaturas moderadas e baixo tempo de retenção. O biopolímero, PHA, obtido após a etapa de secagem, apresenta elevado nível de pureza, baixíssimos níveis de solvente residual, cor, cinzas e impureza e um elevado rendimento global, isto é, uma quantidade de PHA recuperado em relação ao PHA contido na biomassa original superiores a cerca de 90% (peso/peso).

#### EXEMPLOS

##### EXEMPLO 1.1: INATIVAÇÃO DA BIOMASSA FERMENTADA

10m<sup>3</sup> de uma suspensão de biomassa fermentada de *Alcaligenes eutrophus*, contendo 150g/l de matéria seca total, formada por células de bactérias contendo cerca de 60 a 75% em peso de PHB, são passados através de um trocador de calor regenerativo TCR-1, a uma vazão de 4m<sup>3</sup>/h, recebendo, a seguir, injeção direta de vapor, de modo a elevar a temperatura à 85°C. Esta suspensão é conduzida a um tanque de espera, com volume útil de 1m<sup>3</sup> e

32

bombeada de volta ao trocador TCR-1, onde é resfriado pela suspensão de biomassa que entra no processo, por sua vez aquecendo-a. A suspensão de biomassa que deixa o processo, a cerca de 45°C, mantém praticamente inalteradas as concentrações de matéria seca e de PHB. As células de bactéria, porém, têm agora seu sistema enzimático inativado, e portanto sendo incapazes de degradar o PHB acumulado. Esta suspensão é então encaminhada ao processo de coagulação e decantação.

EXEMPLO 1.2.: LAVAGEM E CONCENTRAÇÃO DE BIOMASSA FERMENTADA

Em 5m<sup>3</sup> de Biomassa de PHB fermentada de *Alcaligenes eutrophus* e previamente inativada são adicionados 5m<sup>3</sup> de água sob agitação branda, e em seguida ácido fosfórico até pH 2,8 a 3,5 e leite de cal até pH 7,0 a 8,0. A suspensão de biomassa coagulada recebe então a adição de 10 a 20 ppm de um polieletrólito aniônico, sendo lentamente agitada e em seguida mantida em repouso para decantação. O sobrenadante é então removido, restando um lodo de biomassa com cerca de 10 a 12% de matéria seca. O lodo obtido é então alimentado numa centrífuga decanter numa vazão de cerca de 1200 kg/h, recebendo ainda a adição de polieletrólito numa quantidade suficiente para floculação e água, numa proporção de cerca de 20% (peso/peso) da vazão de lodo alimentado. O clarificado é então removido, gerando-se cerca de 2400kg de lodo com cerca de 20 a 25% de sólidos dos quais 70 a 75% correspondem a PHB.

EXEMPLO 1.3.1 : EXTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE PHB UTILIZANDO ÁLCOOL ISOAMÍLICO COMO SOLVENTE, EM ÚNICO ESTÁGIO DE EXTRAÇÃO

A Biomassa de *Alcaligenes eutrophus* concentrada a 25% de matéria seca e contendo cerca de 60 a 75% de PHB com peso molecular de 1.000.000 Da, é alimentada em um reator mecanicamente agitado, mantido a cerca de 105°C, numa vazão de 350 a 450 kg/h onde recebe a adição de 7290kg/h de álcool isoamílico aquecido a cerca de 105°C e vapor de

33

34

obtidos no processo de extração, da membrana e filtro, são rapidamente resfriados até uma temperatura igual ou inferior a cerca de 45°C de modo a garantir a precipitação de PHB no solvente. O PHB precipitado em álcool isoamílico oriundo da microfiltração por membrana possui peso molecular na faixa de 800.000 e 870.000 Da e da filtração convencional na faixa de 580.000 a 780.000 Da.

Opcionalmente, a corrente de extrato bruto de cerca de 8000kg/h de uma suspensão contendo PHB (peso molecular de cerca de 900.000 Da) e água dissolvidos no álcool isoamílico e resíduos insolúveis de biomassa extraída é diretamente enviada a etapa de filtração, por exemplo em filtros de pratos, onde são obtidas duas correntes: uma de filtrado de cerca de 7800 kg/h que é uma solução de PHB isenta de sólidos insolúveis em suspensão enriquecida em PHB contendo peso molecular entre 580.000 e 780.000 Da; e uma torta contendo os sólidos insolúveis da biomassa extraída de cerca de 200 kg/h. O filtrado obtido no processo, é então rapidamente resfriado até uma temperatura igual ou inferior a cerca de 45°C de modo a garantir a precipitação de PHB no solvente. O PHB precipitado em álcool isoamílico possui peso molecular na faixa de 580.000 a 780.000 Da.

A recuperação de PHB do processo é superior a 95% (peso/peso) em relação ao PHB alimentado da biomassa, isto é, 50 a 80kg de PHB/h, dependendo da vazão de biomassa e pureza da mesma.

#### EXEMPLO 1.3.2 : EXTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE PHB UTILIZANDO ÁLCOOL ISOAMÍLICO COMO SOLVENTE, EM TRIPLO ESTÁGIO DE EXTRAÇÃO

Em um arranjo de três reatores em série, a Biomassa de *Alcaligenes eutrophus* concentrada a até 25% de matéria seca e contendo cerca de 60 a 75% de PHB com peso molecular de cerca de 1.000.000 Da, é alimentada no primeiro reator, mecanicamente agitado, mantido a cerca de 105°C e numa razão de 350 a 450 kg/h. No terceiro



reator é alimentado álcool isoamílico numa vazão de 7290 kg/h aquecido à cerca de 105°C. Vapor de álcool isoamílico a 135°C é alimentado nos três estágios de extração em quantidade suficiente para garantir a evaporação do excesso de água contido no lodo. Este procedimento leva à geração de uma corrente total de vapor de água e isoamílico de cerca de 1250 kg/h, sendo composta respectivamente de cerca de 15% de água e 85% de álcool isoamílico, e uma outra corrente, efluente do primeiro estágio de extração, denominada de extrato bruto, de cerca de 8000 kg/h de uma suspensão contendo PHB e água dissolvidos no álcool isoamílico e resíduos insolúveis de biomassa extraída. O extrato bruto, efluente do primeiro estágio, é então continuamente alimentado no hidrociclone 1, onde o fluxo é separado em duas correntes: uma corrente de topo, compreendendo cerca de 75% da vazão de alimentação e contendo cerca de 40% a 45% dos sólidos insolúveis originalmente contidos no extrato bruto alimentado; e outra de fundo (na parte inferior) de cerca de 25% do fluxo alimentado e contendo cerca de 55% a 60% dos sólidos insolúveis originalmente neste contidos que é encaminhada ao estágio seguinte (2). A corrente de topo do hidrociclone 1, pobre em sólidos insolúveis, é então alimentada numa unidade de microfiltração por membrana, numa vazão de 6000 kg/h, gerando uma corrente de cerca de 2000 kg/h (1/3) concentrada em sólidos insolúveis residuais da biomassa extraída e uma corrente de permeado de 4000 kg/h (2/3) isenta de sólidos insolúveis residuais da biomassa extraída. A corrente de fundo do hidrociclone 1 é encaminhada para o segundo estágio de extração onde recebe a corrente de topo do hidrociclone 3 e a corrente concentrada em sólidos insolúveis gerado na microfiltração por membrana. A corrente de fundo do hidrociclone 3, contendo cerca de 55 a 65% dos sólidos insolúveis de biomassa extraída, é então enviada para uma etapa de filtração, por exemplo em filtro de pratos, numa

36

razão de 2000 kg/h, gerando uma corrente de cerca de 1800 kg/h, que é uma solução de PHB isenta de sólidos insolúveis em suspensão, e uma torta contendo os sólidos insolúveis da biomassa extraída de cerca de 200 kg/h. A recuperação de PHB do processo é superior a 98% (peso/peso) em relação ao PHB alimentado da biomassa, isto é, 51 a 82 kg de PHB/h, dependendo da vazão de biomassa alimentada e sua pureza. Ambos os filtrados obtidos no processo de extração, da membrana e filtro, são rapidamente resfriados até uma temperatura igual ou inferior a cerca de 45°C, de modo a garantir a precipitação de PHB no solvente, álcool isoamílico. Opcionalmente a corrente de topo do hidrociclone 1 de cerca de 6000 kg/h, pobre em sólidos insolúveis, é então diretamente enviada a etapa de filtração, por exemplo em filtros de pratos, onde são obtidas duas correntes: uma de filtrado de cerca de 5800 kg/h que é uma solução de PHB isenta de sólidos insolúveis em suspensão enriquecida em PHB contendo peso molecular entre 650.000 e 780.000 Da; e uma torta contendo os sólidos insolúveis da biomassa extraída de cerca de 200 kg/h. O filtrado obtido no processo, é então rapidamente resfriado até uma temperatura igual ou inferior a cerca de 45°C de modo a garantir a precipitação de PHB no solvente. O PHB precipitado em álcool isoamílico possui peso molecular na faixa de 650.000 a 780.000 Da. A recuperação de PHB do processo é superior a 95% (peso/peso) em relação ao PHB alimentado da biomassa, isto é, 50 a 80kg de PHB/h, dependendo da vazão de biomassa e pureza da mesma.

#### EXEMPLO 1.3.3 : EXTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE PHB UTILIZANDO ACETATO DE ISOAMILA COMO SOLVENTE.

Teste de solubilidade de PHB em acetato de isoamila: foram adicionados num balão de destilação de fundo redondo com capacidade 500ml, 31g de biomassa concentrada de *Alcaligenes eutrophus*, contendo 28,11% de matéria seca e 16,09% de PHB com peso molecular de 1.000.000 Da, e

37

250g de acetato de isoamila. A suspensão foi então submetida, sob agitação, à evaporação do solvente e água, utilizando-se uma manta aquecedora acoplada ao balão de destilação. O vapor binário assim gerado foi encaminhado a um condensador de tubo reto (tipo Liebig) para condensação e o condensado resultante coletado em um recipiente tipo erlenmeyer. A suspensão foi mantida em processo de evaporação sob agitação até a temperatura de extração ser atingida. A leitura de temperatura foi efetuada através de termômetro de mercúrio fixado em uma das bocas do balão e mantido em contato com a fase vapor no interior do balão. A temperatura de extração foi atingida após decorrer um tempo de evaporação de cerca de 14 minutos, passando a temperatura de ebulição da mistura de cerca de 104°C (temperatura inicial) para cerca de 123°C (temperatura de extração), sendo gerados neste período cerca de 34 ml de condensado; constituído de cerca de 70% (v/v) de acetato de isoamila sendo o restante do volume a água proveniente da biomassa concentrada. A suspensão foi então mantida em regime de refluxo de condensado e sob agitação por cerca de 10 minutos, na temperatura de 123°C (temperatura de extração), sendo posteriormente filtrada em papel filtro, ainda a quente, para separação entre a parte insolúvel e a parte dissolvida no solvente filtrado. O material filtrado a quente, contendo cerca de 0,90% (p/p) de PHB solubilizado, foi então resfriado para precipitação do PHB, foi concentrado através de filtração, submetido à evaporação do solvente e posteriormente a secagem. O PHB obtido, apresentou um peso molecular de cerca de 495.000 Da. A quantidade de biomassa concentrada, utilizada para os ensaios, foi de cerca de 2,0 a 3,5 vezes maior que a quantidade necessária para atingir-se a concentração de saturação de PHB no solvente, na temperatura de extração utilizada. Deste modo pôde-se determinar a concentração de saturação do soluto (PHB) no solvente (acetato de

38

isoamila) para a temperatura de extração empregada.

Teste de extração de PHB em acetato de isoamila: foram adicionados num balão de destilação de fundo redondo com capacidade 500ml, 10 g de biomassa concentrada de *Alcaligenes eutrophus*, contendo 28,11% de matéria seca e 16,09% de PHB como peso molecular da ordem de 1.000.000 Da, e 200g de acetato de isoamila. A suspensão foi então submetida, a evaporação do solvente e água, utilizando-se uma manta aquecedora acoplada ao balão de destilação, sendo o vapor binário assim gerado encaminhado a um condensador de tubo reto (tipo Liebig) para condensação e o condensado resultante coletado em um recipiente tipo erlenmeyer. A suspensão foi mantida em processo de evaporação sob agitação até a temperatura de extração ser atingida. A leitura de temperatura foi efetuada através de termômetro de mercúrio fixado em uma das bocas do balão e mantido em contato com a fase vapor no interior do balão. A suspensão foi então mantida em regime de refluxo de condensado e sob agitação por cerca de 10 minutos, na temperatura de 123°C (temperatura de extração). O material assim obtido foi então submetido a um processo de decantação a quente, sendo desta forma, o resíduo sólido insolúvel resultante da extração separado do PHB solubilizado no solvente. A solução contendo PHB dissolvido foi resfriada para precipitação de PHB, sendo medida a massa PHB extraída nesta etapa. O resíduo sólido obtido na primeira etapa recebeu a nova adição de 200 g de acetato de isoamila e foi novamente submetido a extração por 10 minutos. Os demais procedimentos foram repetidos até serem totalizados, três etapas de extração. Cerca de 41% do PHB originalmente contido na biomassa celular, foi extraído na primeira etapa, 13 % na segunda etapa e 8% na terceira etapa. O PHB assim obtido ficou na faixa de 730.000 Da a 750.000 Da.

#### 35 EXEMPLO DE EXTRAPOLAÇÃO PARA ESCALA INDUSTRIAL

A Biomassa de *Alcaligenes eutrophus* concentrada a 28,11% de matéria seca e contendo 16,09% de PHB com peso

39

molecular de cerca de 1.000.000 Da , é alimentada em um reator mecanicamente agitado, mantido a cerca de 123°C, numa vazão de 500 kg/h onde recebe a adição de 9.521 kg/h de acetato de isoamila aquecido à cerca de 123°C, na  
5 forma líquida e vapor , em quantidade suficiente para evaporar o excesso de água contido no lodo, gerando uma corrente de cerca de 833 kg/h de vapor composto de cerca de 30% (v/v) de água e 70% (v/v) de acetato de isoamila, e uma outra corrente, denominada de extrato bruto, de  
10 cerca de 8.969 kg/h de uma suspensão contendo PHB e água, dissolvidos no acetato de isoamila, e resíduos insolúveis de biomassa extraída. O extrato bruto é então continuamente alimentado num hidrociclone, onde o fluxo é separado em duas correntes: uma corrente de cerca de 75%  
15 da vazão de alimentação na parte superior e contendo cerca de 35% dos sólidos insolúveis originalmente contidos no extrato bruto alimentado; e outra na parte inferior de cerca de 25% do fluxo alimentado e contendo cerca de 65% dos sólidos insolúveis originalmente neste  
20 contidos. A corrente superior do hidrociclone, pobre em sólidos insolúveis, é então alimentada numa unidade de microfiltração por membrana, numa razão de 6.891 kg/h, gerando uma corrente de cerca de 1.149 kg/h (1/6) concentrada em sólidos insolúveis residuais da biomassa  
25 extraída e uma corrente de permeado de 5.743 kg/h (5/6) isenta de sólidos insolúveis residuais da biomassa extraída. O tempo de retenção no processo é de cerca de 10 minutos. A corrente rica em sólidos insolúveis do hidrociclone (fase inferior) e da membrana são então  
30 misturadas e enviadas a uma etapa de filtração, por exemplo em filtro de pratos, numa razão de 3.446 kg/h, gerando uma corrente de cerca de 3.294 kg/h,, que é uma solução de PHB isenta de sólidos insolúveis em suspensão, e uma torta contendo os sólidos insolúveis da biomassa  
35 extraída de cerca de 151,5 kg/h. A recuperação de PHB do processo é superior a 95% (peso/peso) em relação ao PHB alimentado da biomassa, isto é, 70 a 80kg de PHB/h,

40

dependendo da vazão de biomassa e pureza da mesma. Ambos os filtrados obtidos no processo de extração, da membrana e filtro, são rapidamente resfriados até uma temperatura igual ou inferior a cerca de 45°C de modo a garantir a precipitação de PHB no solvente.

EXEMPLO 1.3.4 : EXTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE PHB UTILIZANDO ACETATO DE BUTILA COMO SOLVENTE

Teste de solubilidade de PHB em acetato de butila:

Foram adicionados num balão de destilação de fundo redondo com capacidade 500ml, 31g de biomassa concentrada de *Alcaligenes eutrophus*, contendo 28,11% de matéria seca e 16,09% de PHB e peso molecular de 1.000.000 Da, e 250g de acetato de butila. A suspensão foi então submetida, sob vigorosa agitação, a evaporação do solvente e água, utilizando-se uma manta aquecedora acoplada ao balão de destilação, sendo o vapor binário assim gerado encaminhado a um condensador de tubo reto (tipo Liebig) para condensação e o condensado resultante coletado em um recipiente tipo erlenmeyer. A suspensão foi mantida em processo de evaporação sob agitação até a temperatura de extração ser atingida. A leitura de temperatura foi efetuada através de termômetro de mercúrio fixado em uma das bocas do balão e mantido em contato com a fase vapor no interior do balão. A temperatura de extração foi atingida após decorrer um tempo de evaporação de cerca de 28 minutos, passando a temperatura de ebulição da mistura de cerca de 91,5°C (temperatura inicial) para cerca de 121,5°C (temperatura de extração,) sendo gerados neste período cerca de 131 ml de condensado; constituído de cerca de 83% (v/v) de acetato de isoamila sendo o restante do volume a água proveniente da biomassa concentrada. A suspensão foi então mantida em regime de refluxo de condensado e sob agitação por cerca de 10 minutos, na temperatura de 121,5°C (temperatura de extração), sendo posteriormente filtrada em papel filtro, ainda a quente para separação de parte insolúvel da parte dissolvida no solvente filtrado. O material

filtrado a quente, contendo cerca de 0,98%(p/p) de PHB solubilizado, foi então resfriado para precipitação do PHB, foi concentrado através de filtração, submetido à evaporação do solvente e posteriormente a secagem. O PHB obtido, apresentou um peso molecular de cerca de 502.000Da. A quantidade de biomassa concentrada, utilizada para os ensaios, foi de cerca de 2,0 a 3,5 vezes superior à quantidade necessária para atingir-se a concentração de saturação de PHB no solvente, na temperatura de extração utilizada. Deste modo pôde-se determinar a concentração de saturação do soluto (PHB) no solvente (acetato de isoamila) para a temperatura de extração empregada.

Teste de extração de PHB em acetato de butila: foram adicionados num balão de destilação de fundo redondo com capacidade 500ml, 10<sup>-1</sup> g de biomassa concentrada de *Alcaligenes eutrophus*, contendo 28,11% de matéria seca e 16,09% de PHB e peso molecular de 1.000.000 Da, e 200g de acetato de butila. A suspensão foi então submetida, a evaporação do solvente e água, utilizando-se uma manta aquecedora acoplada ao balão de destilação, sendo o vapor binário assim gerado encaminhado a um condensador de tubo reto (tipo Liebig) para condensação e o condensado resultante coletado em um recipiente tipo erlenmeyer. A suspensão foi mantida em processo de evaporação sob agitação até a temperatura de extração ser atingida. A leitura de temperatura foi efetuada através de termômetro de mercúrio fixado em uma das bocas do balão e mantido em contato com a fase vapor no interior do balão. A suspensão foi então mantida em regime de refluxo de condensado e sob agitação por cerca de 10 minutos, na temperatura de 121,5°C (temperatura de extração), O material assim obtido foi então submetido a um processo de decantação, a quente, sendo o resíduo sólido insolúvel resultante da extração separado do PHB solubilizado no solvente. A solução contendo PHB dissolvido foi resfriada para precipitação de PHB, sendo medida a massa PHB extraída

nesta etapa. O resíduo sólido obtido na primeira etapa recebeu a nova adição de 200 g de acetato de butila e foi novamente submetido a extração por 10 minutos. Os demais procedimentos foram repetidos até serem totalizados, três etapas de extração. Cerca de 62,5% do PHB contido originalmente na biomassa celular, foi extraído na primeira etapa, 18,5 % na segunda etapa e 7,0% na terceira etapa. O peso molecular do PHB obtido ficou na faixa de 740.000 Da a 780.000 Da.

#### 10 EXEMPLO DE EXTRAPOLAÇÃO PARA ESCALA INDUSTRIAL

A Biomassa de *Alcaligenes eutrophus* concentrada a 28,11% de matéria seca e contendo cerca de 16,09% de PHB e peso molecular de cerca de 1.000.000 Da, é alimentada em um reator mecanicamente agitado, mantido a cerca de 121,5°C, numa vazão de 500 kg/h onde recebe a adição de 9.577 kg/h de acetato de butila aquecido à cerca de 121,5°C, na forma líquida e vapor, em quantidade suficiente para evaporar o excesso de água contido no lodo, gerando uma corrente de cerca de 1732 kg/h de vapor composto de cerca de 17 % de água e 83 % de acetato de butila, e uma outra corrente, denominada de extrato bruto, de cerca de 8.175 kg/h de uma suspensão contendo PHB e água dissolvidos no acetato de butila e resíduos insolúveis de biomassa extraída. O extrato bruto é então continuamente alimentado num hidrociclone, onde o fluxo é separado em duas correntes: uma corrente de cerca de 75% da vazão de alimentação na parte superior e contendo cerca de 35% dos sólidos insolúveis originalmente contidos no extrato bruto alimentado; e outra na parte inferior de cerca de 25% do fluxo alimentado e contendo cerca de 65% dos sólidos insolúveis originalmente neste contidos. A corrente superior do hidrociclone, pobre em sólidos insolúveis, é então alimentada numa unidade de microfiltração por membrana, numa razão de 6.258 kg/h, gerando uma corrente de cerca de 1.043 kg/h (1/6) concentrada em sólidos insolúveis residuais da biomassa extraída e uma corrente de permeado de 5.215 kg/h (5/6)



isenta de sólidos insolúveis residuais da biomassa extraída. O tempo de retenção no processo é de cerca de 10 minutos. A corrente rica em sólidos insolúveis do hidrociclone (fase inferior) e da membrana são então  
 5 misturadas e enviadas a uma etapa de filtração, por exemplo em filtro de pratos, numa razão de 3.129 kg/h, gerando uma corrente de cerca de 2.978 kg/h,, que é uma solução de PHA isenta de sólidos insolúveis em suspensão, e uma torta contendo os sólidos insolúveis da biomassa  
 10 extraída de cerca de 151,5 kg/h. A recuperação de PHBV do processo é superior a 95% (peso/peso) em relação ao PHBV alimentado da biomassa, isto é, 70 a 80kg de PHBV/h, dependendo da vazão de biomassa e pureza da mesma. Ambos os filtrados obtidos no processo de extração, da membrana  
 15 e filtro, são rapidamente resfriados até uma temperatura igual ou inferior a cerca de 45°C de modo a garantir a precipitação de PHBV no solvente.

EXEMPLO 1.3.5 : EXTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE PHB UTILIZANDO PROPIONATO DE PROPILA COMO SOLVENTE

20 Teste de solubilidade de PHB em propionato de propila: foram adicionados num balão de destilação de fundo redondo com capacidade 500ml, 31g de biomassa concentrada de *Alcaligenes eutrophus*, contendo 28,11% de matéria seca e 16,09% de PHB e peso molecular de 1.000.000 Da, e 250g  
 25 de propionato de propila. A suspensão foi então submetida, sob vigorosa agitação, a evaporação do solvente e água, utilizando-se uma manta aquecedora acoplada ao balão de destilação, sendo o vapor binário assim gerado encaminhado a um condensador de tubo reto  
 30 (tipo Liebig) para condensação e o condensado resultante coletado em um recipiente tipo erlenmeyer. A suspensão foi mantida em processo de evaporação sob vigorosa agitação até a temperatura de extração ser atingida. A leitura de temperatura foi efetuada através de termômetro  
 35 de mercúrio fixado em uma das bocas do balão e mantido em contato com a fase vapor no interior do balão. A temperatura de extração foi atingida após decorrer um

44

tempo de evaporação de cerca de 15 minutos, passando a temperatura de ebulição da mistura de cerca de 92°C (temperatura inicial) para cerca de 113°C (temperatura de extração,) sendo gerados neste período  
5 cerca de 100 ml de condensado; constituído de cerca de 80% (v/v) de propionato de propila sendo o restante do volume a água proveniente da biomassa concentrada. A suspensão foi então mantida em regime de refluxo de condensado e sob vigorosa agitação por cerca de 10  
10 minutos, na temperatura de 113°C (temperatura de extração), sendo posteriormente filtrada em papel filtro, ainda a quente para separação de parte insolúvel da parte dissolvida no solvente filtrado. O material filtrado a quente, contendo cerca de 1,24% (p/p) de PHB  
15 solubilizado, foi então resfriado para precipitação do PHB, foi concentrado através de filtração, submetido à evaporação do solvente e posteriormente a secagem. O PHB obtido, apresentou um peso molecular de cerca de 430.000 Da. A quantidade de biomassa concentrada,  
20 utilizada para os ensaios, foi de cerca de 2,0 a 3,5 vezes superior à quantidade necessária para atingir-se a concentração de saturação de PHB no solvente, na temperatura de extração utilizada. Deste modo pôde-se determinar a concentração de saturação do soluto (PHB) no  
25 solvente (propionato de propila) para a temperatura de extração empregada.

Teste de extração de PHB em propionato de propila:

Foram adicionados num balão de destilação de fundo redondo com capacidade 500ml, 10 g de biomassa  
30 concentrada de *Alcaligenes eutrophus*, contendo 28,11% de matéria seca e 16,09% de PHB e peso molecular de 1.000.000 Da, e 200g de propionato de propila. A suspensão foi então submetida, a evaporação do solvente e água, utilizando-se uma manta aquecedora acoplada ao  
35 balão de destilação, sendo o vapor binário assim gerado encaminhado a um condensador de tubo reto (tipo Liebig) para condensação e o condensado resultante coletado em

um recipiente tipo erlenmeyer. A suspensão foi mantida em processo de evaporação sob agitação até a temperatura de extração ser atingida. A leitura de temperatura foi efetuada através de termômetro de mercúrio fixado em uma das bocas do balão e mantido em contato com a fase vapor no interior do balão. A suspensão foi então mantida em regime de refluxo de condensado e sob agitação por cerca de 10 minutos, na temperatura de 113°C (temperatura de extração), O material assim obtido foi, então, submetido a um processo de decantação a quente, sendo o resíduo sólido insolúvel resultante da extração separado do PHB solubilizado no solvente. A solução contendo PHB dissolvido foi resfriada para precipitação de PHB, sendo medida a massa PHB extraída nesta etapa. O resíduo sólido obtido na primeira etapa recebeu a nova adição de 200 g de propionato de propila e foi novamente submetido a extração por 10 minutos. Os demais procedimentos foram repetidos até serem totalizados, três etapas de extração. Cerca de 62,0% do PHB contido originalmente na biomassa celular, foi extraído na primeira etapa, 18,5 % na segunda etapa e 6,0% na terceira etapa. O peso molecular do PHB obtido foi da ordem de 730.000 Da.

#### EXEMPLO EXTRAPOLADO PARA ESCALA INDUSTRIAL

A Biomassa de *Alcaligenes eutrophus* concentrada a 28,11% de matéria seca e contendo cerca de 16,09% de PHB e peso molecular de cerca de 1.000.000 Da, é alimentada em um reator mecanicamente agitado, mantido a cerca de 113°C, numa vazão de 500 kg/h onde recebe a adição de 7.406 kg/h de acetato de butila aquecido à cerca de 113°C, na forma líquida e vapor, em quantidade suficiente para evaporar o excesso de água contido no lodo, gerando uma corrente de cerca de 1.156 kg/h de vapor composto de cerca de 20 % de água e 80 % de propionato de propila, e uma outra corrente, denominada de extrato bruto, de cerca de 7.406 kg/h de uma suspensão contendo PHB e água dissolvidos no acetato de butila e resíduos insolúveis de biomassa extraída. O extrato bruto é então continuamente

46

alimentado num hidrociclone, onde o fluxo é separado em duas correntes: uma corrente de cerca de 75% da vazão de alimentação na parte superior e contendo cerca de 35% dos sólidos insolúveis originalmente contidos no extrato  
5 bruto alimentado; e outra na parte inferior de cerca de 25% do fluxo alimentado e contendo cerca de 65% dos sólidos insolúveis originalmente neste contidos. A corrente superior do hidrociclone, pobre em sólidos insolúveis, é então alimentada numa unidade de  
10 microfiltração por membrana, numa razão de 5.063 kg/h, gerando uma corrente de cerca de 844 kg/h (1/6) concentrada em sólidos insolúveis residuais da biomassa extraída e uma corrente de permeado de 4.219 kg/h (5/6) isenta de sólidos insolúveis residuais da biomassa  
15 extraída. O tempo de retenção no processo é de cerca de 10 minutos. A corrente rica em sólidos insolúveis do hidrociclone (fase inferior) e da membrana são então misturadas e enviadas a uma etapa de filtração, por exemplo em filtro de pratos, numa razão de 2.531 kg/h,  
20 gerando uma corrente de cerca de 2.380 kg/h,, que é uma solução de PHA isenta de sólidos insolúveis em suspensão, e uma torta contendo os sólidos insolúveis da biomassa extraída de cerca de 151,5 kg/h. A recuperação de PHBV do processo é superior a 95% (peso/peso) em relação ao PHBV  
25 alimentado da biomassa, isto é, 70 a 80kg de PHBV/h, dependendo da vazão de biomassa e pureza da mesma. Ambos os filtrados obtidos no processo de extração, da membrana e filtro, são rapidamente resfriados até uma temperatura igual ou inferior a cerca de 45°C de modo a garantir a  
30 precipitação de PHBV no solvente.  
A Biomassa de *Alcaligenes eutrophus* concentrada a 25% de matéria seca e contendo cerca de 60 a 75% de PHB com peso molecular de cerca de 1.000.000 Da, é alimentada em um reator mecanicamente agitado, mantido a cerca de 95 a  
35 105°C, numa vazão de 500 kg/h onde recebe a adição de 8000 kg/h de propionato de propila aquecido a cerca de 130°C e vapor de propionato de propila a 130°C, em

quantidade suficiente para evaporar o excesso de água contido no lodo, gerando uma corrente de cerca de 1.230kg/h de vapor composto de cerca de 24 % de água e 76 % de propionato de propila, e uma outra corrente, denominada de extrato bruto, de cerca de 8268 kg/h de uma suspensão contendo PHB e água dissolvidos no propionato de propila e resíduos insolúveis de biomassa extraída. O extrato bruto é então continuamente alimentado num hidrociclone, onde o fluxo é separado em duas correntes: uma corrente de cerca de 75% da vazão de alimentação na parte superior e contendo cerca de 35% dos sólidos insolúveis originalmente contidos no extrato bruto alimentado; e outra na parte inferior de cerca de 25% do fluxo alimentado e contendo cerca de 65% dos sólidos insolúveis originalmente neste contidos. A corrente superior do hidrociclone, pobre em sólidos insolúveis, é então alimentada numa unidade de microfiltração por membrana, numa razão de 6201 kg/h, gerando uma corrente de cerca de 1034 kg/h (1/6) concentrada em sólidos insolúveis residuais da biomassa extraída e uma corrente de permeado de 5167 kg/h (5/6) isenta de sólidos insolúveis residuais da biomassa extraída. O tempo de retenção no processo é de cerca de 3 a 10 minutos. A corrente rica em sólidos insolúveis do hidrociclone (fase inferior) e da membrana são então misturadas e enviadas a uma etapa de filtração, por exemplo em filtro de pratos, numa razão de 3100 kg/h, gerando uma corrente de cerca de 2850 kg/h,, que é uma solução de PHB isenta de sólidos insolúveis em suspensão, e uma torta contendo os sólidos insolúveis da biomassa extraída de cerca de 250 kg/h. A recuperação de PHB do processo é superior a 95% (peso/peso) em relação ao PHB alimentado da biomassa, isto é, 70 a 90kg de PHB/h, dependendo da vazão de biomassa e pureza da mesma. Ambos os filtrados obtidos no processo de extração, da membrana e filtro, são rapidamente resfriados até uma temperatura igual ou inferior a cerca de 45°C de modo a garantir a

48

precipitação de PHB no solvente.

EXEMPLO 1.3.6 : EXTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DE PHB UTILIZANDO 1-HEXANOL COMO SOLVENTE, EM ÚNICO ESTÁGIO DE EXTRAÇÃO

Teste de solubilidade de PHB em hexanol: foram  
5 adicionados num balão de destilação de fundo redondo com  
capacidade 500ml, 31g de biomassa concentrada de *Alcaligenes eutrophus*, contendo 28,11% de matéria seca e  
16,09% de PHB e peso molecular de 1.000.000 Da, e 250g de  
hexanol. A suspensão foi então submetida, sob agitação,  
10 a evaporação do solvente e água, utilizando-se uma manta  
aquecedora acoplada ao balão de destilação, sendo o vapor  
binário assim gerado encaminhado a um condensador de  
tubo reto (tipo Liebig) para condensação e o condensado  
resultante coletado em um recipiente tipo erlenmeyer. A  
15 suspensão foi mantida em processo de evaporação sob  
vigorosa agitação até a temperatura de extração ser  
atingida. A leitura de temperatura foi efetuada através de  
termômetro de mercúrio fixado em uma das bocas do balão e  
mantido em contato com a fase vapor no interior do balão.  
20 A temperatura de extração foi atingida após decorrer um  
tempo de evaporação de cerca de 15 minutos, passando a  
temperatura de ebulição da mistura de cerca de  
104°C (temperatura inicial) para cerca de 133°C  
(temperatura de extração,) sendo gerados neste período  
25 cerca de 34 ml de condensado; constituído de cerca de  
44% (v/v) de hexanol, sendo o restante do volume a água  
proveniente da biomassa concentrada. A suspensão foi  
então mantida em regime de refluxo de condensado e sob  
vigorosa agitação por cerca de 10 minutos, na temperatura  
30 de 133°C (temperatura de extração), sendo posteriormente  
filtrada em papel filtro, ainda a quente para separação de  
parte insolúvel da parte dissolvida no solvente filtrado.  
O material filtrado a quente, contendo cerca de  
0,83% (p/p) de PHB solubilizado, foi então resfriado para  
35 precipitação do PHB, foi concentrado através de  
filtração, submetido à evaporação do solvente e  
posteriormente a secagem. O PHB obtido, apresentou um peso

49

molecular de cerca de 430.000 Da. A quantidade de biomassa concentrada, utilizada para os ensaios, foi de cerca de 2,0 a 3,5 vezes superior à quantidade necessária para atingir-se a concentração de saturação de PHB no solvente, na temperatura de extração utilizada. Deste modo pôde-se determinar a concentração de saturação do soluto (PHB) no solvente (hexanol) para a temperatura de extração empregada.

Teste de extração de PHB em hexanol:

Foram adicionados num balão de destilação de fundo redondo com capacidade 500ml, 10 g de biomassa concentrada de *Alcaligenes eutrophus*, contendo 28,11% de matéria seca e 16,09% de PHB e peso molecular de 1.000.000 Da, e 200g de hexanol. A suspensão foi então submetida, a evaporação do solvente e água, utilizando-se uma manta aquecedora acoplada ao balão de destilação, sendo o vapor binário assim gerado encaminhado a um condensador de tubo reto (tipo Liebig) para condensação e o condensado resultante coletado em um recipiente tipo erlenmeyer. A suspensão foi mantida em processo de evaporação sob agitação até a temperatura de extração ser atingida. A leitura de temperatura foi efetuada através de termômetro de mercúrio fixado em uma das bocas do balão e mantido em contato com a fase vapor no interior do balão. A suspensão foi então mantida em regime de refluxo de condensado e sob agitação por cerca de 10 minutos, na temperatura de 133°C (temperatura de extração), O material assim obtido foi então submetido a um processo de decantação a quente, sendo o resíduo sólido insolúvel resultante da extração separado do PHB solubilizado no solvente. A solução contendo PHB dissolvido foi resfriada para precipitação de PHB, sendo medida a massa PHB extraída nesta etapa. O resíduo sólido obtido na primeira etapa recebeu a nova adição de 200 g de hexanol e foi novamente submetido a extração por 10 minutos. Os demais procedimentos foram repetidos até serem totalizadas três etapas de extração. Cerca de 64,5%

do PHB contido originalmente na biomassa celular, foi extraído na primeira etapa, 19,0 % na segunda etapa e 8,0% na terceira etapa. O peso molecular do PHB assim obtido ficou na faixa de 530.000 Da a 680.000 Da.

5 EXEMPLO DE EXTRAPOLAÇÃO PARA ESCALA INDUSTRIAL

59

A Biomassa de *Alcaligenes eutrophus* concentrada a 28,11% de matéria seca e contendo cerca de 16,09% de PHB e peso molecular de cerca de 1.000.000 Da, é alimentada em um reator mecanicamente agitado, mantido a cerca de 133°C, numa vazão de 500 kg/h onde recebe a adição de 10.019 kg/h de hexanol aquecido à cerca de 133°C, na forma líquida e vapor, em quantidade suficiente para evaporar o excesso de água contido no lodo, gerando uma corrente de cerca de 542,6 kg/h de vapor composto de cerca de 20 % de água e 60 % (p/p) de hexanol, e uma outra corrente, denominada de extrato bruto, de cerca de 9.997 kg/h de uma suspensão contendo PHB e água dissolvidos no hexanol e resíduos insolúveis de biomassa extraída. O extrato bruto é então continuamente alimentado num hidrociclone, onde o fluxo é separado em duas correntes: uma corrente de cerca de 75% da vazão de alimentação na parte superior e contendo cerca de 35% dos sólidos insolúveis originalmente contidos no extrato bruto alimentado; e outra na parte inferior de cerca de 25% do fluxo alimentado e contendo cerca de 65% dos sólidos insolúveis originalmente neste contidos. A corrente superior do hidrociclone, pobre em sólidos insolúveis, é então alimentada numa unidade de microfiltração por membrana, numa razão de 7.482 kg/h, gerando uma corrente de cerca de 1.247 kg/h (1/6) concentrada em sólidos insolúveis residuais da biomassa extraída e uma corrente de permeado de 6.235 kg/h (5/6) isenta de sólidos insolúveis residuais da biomassa extraída. O tempo de retenção no processo é de cerca de 10 minutos. A corrente rica em sólidos insolúveis do hidrociclone (fase inferior) e da membrana são então misturadas e enviadas a uma etapa de filtração, por



exemplo em filtro de pratos, numa razão de 3.741 kg/h, gerando uma corrente de cerca de 3.590 kg/h,, que é uma solução de PHA isenta de sólidos insolúveis em suspensão, e uma torta contendo os sólidos insolúveis da biomassa extraída de cerca de 151,5 kg/h. A recuperação de PHBV do processo é superior a 95% (peso/peso) em relação ao PHBV alimentado da biomassa, isto é, 70 a 80kg de PHBV/h, dependendo da vazão de biomassa e pureza da mesma. Ambos os filtrados obtidos no processo de extração, da membrana e filtro, são rapidamente resfriados até uma temperatura igual ou inferior a cerca de 45°C de modo a garantir a precipitação de PHBV no solvente.

EXEMPLO 1.5: EVAPORAÇÃO PARCIAL DE SOLVENTE E LAVAGEM DA SUSPENSÃO DE PHB EM ÁLCOOL ISOAMÍLICO PARA OBTENÇÃO DE AGLOMERADO DE GRÂNULOS DE ALTA POROSIDADE, FRÁGEIS E FACILMENTE CISALHÁVEIS.

Uma suspensão de PHB em uma solução de álcool isoamílico e água, contendo entre 4 a 10% de PHB, é alimentada num evaporador a vácuo, numa vazão de 1.000 kg/h, juntamente com uma corrente de água, contendo álcool isoamílico dissolvido, a uma taxa de 500 a 1000 kg/h e recuperada do processo de extração e purificação. A mistura é então continuamente submetida à evaporação, através da injeção direta de vapor, de modo a, simultaneamente com a remoção de solvente por evaporação, obter-se uma suspensão contendo solvente, água e aglomerados de grânulos de PHB, que são continuamente cisalhados através de um dispositivo mecânico instalado na bomba de circulação do sistema. O material resultante deste processo é uma suspensão de partículas de PHB, finamente divididas, em água e álcool isoamílico nesta dissolvido, que é continuamente retirada do sistema, com uma concentração de partículas de PHB em suspensão entre 4 a 20% (peso/peso) e enviada para o estágio seguinte, de esgotamento de solvente.

EXEMPLO 1.6: ESGOTAMENTO DO ÁLCOOL ISOAMÍLICO (SOLVENTE) DA SUSPENSÃO DE PARTÍCULAS DE PHB FINAMENTE DIVIDIDAS COM

52

### SIMULTÂNEA LAVAGEM E COMINUIÇÃO DO PRODUTO

Uma suspensão de partículas de PHB finamente divididas, obtida conforme exemplificado no exemplo 1.5, contendo de 4 a 20% de sólidos, é alimentada num reator agitado, de esgotamento de solvente (stripping), a uma taxa de 1000 kg/h, onde é admitido vapor por contato direto e água, até obter-se a remoção do álcool isoamílico dissolvido na água, juntamente com uma parcela da mesma, que irão compor a fase vapor efluente do sistema. Simultaneamente a evaporação do álcool isoamílico residual e continuamente a suspensão de partículas de PHB em água é submetida a um processo adicional de cisalhamento, através de um dispositivo semelhante ao descrito no exemplo 1.5. Completado o processo de esgotamento do solvente obtêm-se uma suspensão de PHB em água, finamente dividida, substancialmente pura e isenta de solvente numa concentração de 5 a 20 % de sólidos em suspensão. Esta suspensão é então resfriada e encaminhada para filtração, onde se obtêm uma torta de PHB com cerca de 50 a 80% de umidade, que é em seguida encaminhada para secagem.

53

### REIVINDICAÇÕES

- 1- Processo para recuperação de polihidroxialcanoatos (PHAs) a partir de uma biomassa celular de bactérias obtida por fermentação e na forma de um lodo de biomassa celular em suspensão aquosa e com um teor de matéria celular seca não inferior a cerca de 18% em peso, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de :
- 5
- i) submeter o lodo de biomassa celular concentrado a operações concomitantes de injeção de solvente de PHA, de agitação vigorosa e de aquecimento rápido no interior de um reator, de modo a provocar o rompimento da parede das células da biomassa e a dissolução do PHA contido nessa última e a formar uma suspensão compreendendo solvente de PHA enriquecido com o PHA dissolvido, água remanescente do lodo de biomassa celular e resíduos insolúveis da biomassa celular concentrada;
- 10
- ii) submeter a suspensão formada no reator, a uma etapa de separação para recuperar o solvente, enriquecido com o PHA dissolvido, dos resíduos insolúveis da biomassa celular remanescente;
- 15
- iii) resfriar rapidamente a solução de solvente de PHA enriquecida com PHA, para uma temperatura suficiente para precipitar substancialmente todo o PHA dissolvido;
- 20
- iv) micro-filtrar, a frio, a suspensão de PHA precipitado no solvente de PHA contendo água e impurezas nele dissolvidas, de modo a separar uma pasta concentrada de PHA precipitado;
- 25
- v) submeter a pasta de PHA concentrada a operações simultâneas de lavagem com água, aquecimento e agitação de modo a promover a evaporação de uma certa quantidade de solvente, adequada para a obtenção de uma suspensão contendo grânulos de PHA dotados de alta porosidade, frágeis e facilmente cisalháveis, o solvente remanescente e água;
- 30
- vi) submeter os grânulos de PHA, lavados e aquecidos, a agitação e cisalhamento, para rompê-los rapidamente, enquanto se processa o esgotamento do solvente residual
- 35
- 54

através da injeção de vapor d'água na suspensão contendo o solvente remanescente e água, de modo a obter partículas de PHA purificadas na suspensão; e

vii) separar as partículas de PHA purificadas da suspensão.

2- Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o solvente de PHA utilizado ser selecionado do grupo de solventes constituído por: acetato de butila, acetato de isobutila, acetato de amila, acetato de isoamila, álcool isobutílico, 1-butanol, 1-pentanol (álcool amílico), 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol (álcool isoamílico), 3-pentanol, 1-hexanol, ciclohexanol, propionato de propila, propionato de butila, propionato de isobutila, butirato de etila, isobutirato de isobutila, e misturas desses solventes.

3- Processo, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de o solvente utilizado ser o álcool isoamílico, ou misturas isoméricas de álcool isoamílico.

4- Processo, de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de o álcool isoamílico ser obtido do fracionamento do óleo fúsel, como subproduto da fermentação etanólica, sendo o óleo fúsel composto primordialmente pelo álcool isoamílico e seus isômeros, além de impurezas como: etanol, n-propanol, isobutanol, n-butanol e água.

5- Processo, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato do PHA ser selecionado do grupo definido por poli-3-hidroxibutirato (PHB), poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) PHBV e misturas desses polímeros e copolímeros.

6- Processo, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato do PHA ser produzido por fermentação bacteriana, utilizando microrganismos capazes de biosintetizar PHA, utilizando como matéria-prima principal açúcares extraídos da cana-de-açúcar, e onde o

principal insumo energético utilizado para gerar a energia térmica e a energia elétrica requeridas pelo processo é o bagaço de cana-de-açúcar.

5 7- Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do PHA ser selecionado do grupo constituído por poli-3-hidroxibutirato (PHB), poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) PHBV e misturas desses polímeros e copolímeros.

10 8- Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a biomassa celular de bactérias obtidas por fermentação, a ser processada, ser previamente inativada termicamente.

15 9- Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a etapa de injeção de solvente no lodo de biomassa celular concentrado compreender operações de injeção de solvente de PHA líquido e de solvente de PHA na forma de vapor, de modo a provocar o aquecimento da biomassa celular a uma temperatura entre cerca de 90°C e a temperatura de ebulição do solvente à  
20 pressão substancialmente atmosférica e a formar: uma fase líquida compreendendo solvente de PHA enriquecido com PHA e água remanescente do lodo de biomassa celular; uma fase sólida definida pelos resíduos insolúveis da biomassa celular residual; e uma fase vapor contendo vapores de  
25 água e de solvente PHA.

10- Processo, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de compreender a etapa adicional de extrair a fase vapor do interior do reator.

30 11- Processo, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de a pasta de PHA ser lavada com uma corrente de água proveniente da condensação da fase vapor extraída do reator durante a etapa de rompimento celular e de dissolução do PHA.

35 12- Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o lodo de biomassa celular concentrado ser obtido submetendo-se a biomassa celular em suspensão no meio de cultura fermentado a operações de

floculação e concentração das células de biomassa.

13- Processo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de a biomassa celular em suspensão no meio de cultura fermentado a ser disponibilizada ao processo, ser ainda diluída em água, para apresentar uma proporção mássica de água:fermentado de até cerca de 3,0:1,0.

14- Processo, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de a operação de floculação compreender uma etapa de coagulação da biomassa celular realizada por meio da acidificação da biomassa celular diluída, para um pH de cerca de 1,5 a cerca de 5,5 e da adição de um agente alcalinizante até ser alcançado um pH de cerca de 7 a cerca de 12; sendo a operação de floculação das células de biomassa, contendo PHA acumulado, realizada por meio da adição de um agente floculante.

15- Processo, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de a acidificação da biomassa celular diluída ser obtida pela adição de um ácido definido por pelo menos um dos ácidos sulfúrico e fosfórico.

16- Processo, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de o agente alcalizante compreender hidróxido de cálcio.

17- Processo, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de a acidificação ser conduzida de modo a prover um pH de cerca de 2,0 a cerca de 3,0, sendo a adição de agente alcalinizante feita de modo a ajustar o pH da suspensão de biomassa celular diluída, para cerca de 7 a cerca de 12.

18- Processo, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de a operação de floculação compreender uma etapa de coagulação da biomassa celular por meio da adição de um agente alcalinizante até ser alcançado um pH de 7 a cerca de 12, sendo a floculação da biomassa celular, contendo PHA acumulado, realizada por

57

meio da adição de um agente floculante.

- 19- Processo, de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de o agente alcalinizante compreender hidróxido de cálcio.
- 5 20- Processo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de a operação de floculação compreender uma etapa de coagulação da biomassa celular por meio da acidificação da biomassa celular, para um pH de cerca de 1,5 a cerca de 5,5 e da adição de um agente
- 10 alcalinizante até ser alcançado um pH de cerca de 7 a cerca de 12; sendo a floculação da biomassa celular, contendo PHA acumulado, realizada por meio da adição de um agente floculante.
- 15 21- Processo, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de a acidificação da biomassa celular diluída ser obtida pela adição de um ácido definido por pelo menos um dos ácidos sulfúrico e fosfórico.
- 20 22- Processo, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de o agente alcalinizante compreender hidróxido de cálcio.
- 25 23- Processo, de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de a acidificação ser conduzida de modo a prover um pH de cerca de 2,0 a cerca de 3,0, sendo a adição do agente alcalinizante feita de modo a ajustar o pH da suspensão de biomassa celular para cerca de 7 a cerca de 12.
- 30 24- Processo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de a operação de floculação compreender uma etapa de coagulação da biomassa celular por meio da adição de um agente alcalinizante até ser alcançado um pH de 7 a cerca de 12, sendo a floculação da biomassa celular, contendo PHA acumulado, realizada por meio da adição de um agente floculante.
- 35 25- Processo, de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de o agente alcalinizante compreender hidróxido de cálcio.

58

59

- 26- Processo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de a concentração das células de biomassa floculadas ser realizada por pelo menos uma das operações de decantação e centrifugação.
- 5 27- Processo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de o lodo de biomassa celular, em suspensão no meio de cultura fermentado, floculado, ser submetido a uma lavagem em água e a uma concentração para a faixa de 18 a 45%, preferivelmente de 25 a 45% em peso
- 10 de matéria celular seca.
- 28- Processo, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de a etapa de lavagem e concentração do lodo de biomassa celular ser realizada por sujeição simultânea dessa última a um fluxo de água e
- 15 a efeitos de força centrífuga.
- 29- Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de o solvente de PHA líquido, injetado no lodo de biomassa celular concentrado, ser aquecido.
- 20 30- Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a etapa de separação do solvente de PHA enriquecido com PHA nele dissolvido, dos resíduos insolúveis de biomassa remanescente contidos na suspensão formada no interior do reator, compreender pelo
- 25 menos uma das operações de micro-filtração por membrana e de filtração em filtros de pré-capa.
- 31- Processo, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de a etapa de separação do solvente de PHA enriquecido com PHA nele dissolvido, dos
- 30 resíduos insolúveis de biomassa remanescente contidos na suspensão formada no interior do reator, compreender uma etapa de submeter a referida suspensão a uma separação por efeito de força centrífuga de baixa intensidade.
- 32- Processo, de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de a força centrífuga de baixa
- 35 intensidade, utilizada na etapa de separação da solução de PHA enriquecida com PHA nela dissolvido dos resíduos



insolúveis de biomassa remanescente, contidos na suspensão formada no interior do reator, ser obtida por meio de hidrociclones, produzindo uma suspensão com baixa concentração de ditos resíduos, e uma outra suspensão concentrada de ditos resíduos. 60

5.

33- Processo, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de a suspensão com baixa concentração de resíduos insolúveis de biomassa, que deixa os hidrociclones, ser rapidamente submetida a uma etapa adicional de separação, para remoção integral dos resíduos antes de ser submetida à etapa de resfriamento.

10

34- Processo, de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de a etapa adicional de separação ser feita por micro-filtração por membrana, de modo a produzir uma solução de PHA dissolvido no solvente de PHA, isenta de resíduos insolúveis, e uma suspensão concentrada em resíduos insolúveis de biomassa e contendo uma fração de PHA dissolvido no solvente de PHA, água, cinzas e compostos coloridos dissolvidos no solvente de PHA.

15

20

35- Processo, de acordo com a reivindicação 34, caracterizada pelo fato de a suspensão concentrada em resíduos insolúveis de biomassa celular ser submetida a uma etapa de filtração, de modo a produzir uma torta contendo os resíduos insolúveis de biomassa e uma solução filtrada de PHA dissolvido em solvente, isenta de resíduos insolúveis, a ser rapidamente submetida à etapa de resfriamento.

25

36- Processo, de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de a solução de PHA dissolvido no solvente de PHA, e isenta de resíduos insolúveis, representar cerca de 50 a 90% em peso da suspensão em micro-filtração, sendo que a suspensão concentrada em resíduos de biomassa celular representa cerca de 10 a 50% em peso de dita suspensão em micro-filtração.

30

35

37- Processo, de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de a suspensão concentrada de

resíduos insolúveis de biomassa que deixa os hidrociclones ser submetida a uma etapa de filtração, para separação dos resíduos insolúveis de biomassa, antes de ser submetida à etapa de resfriamento.

5 38- Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de a etapa de microfiltrar, a frio, a suspensão de PHA precipitado no solvente de PHA ser realizada de modo a produzir uma pasta de PHA com uma concentração de PHA entre cerca de 3,5% a 8,0% em  
10 peso por peso.

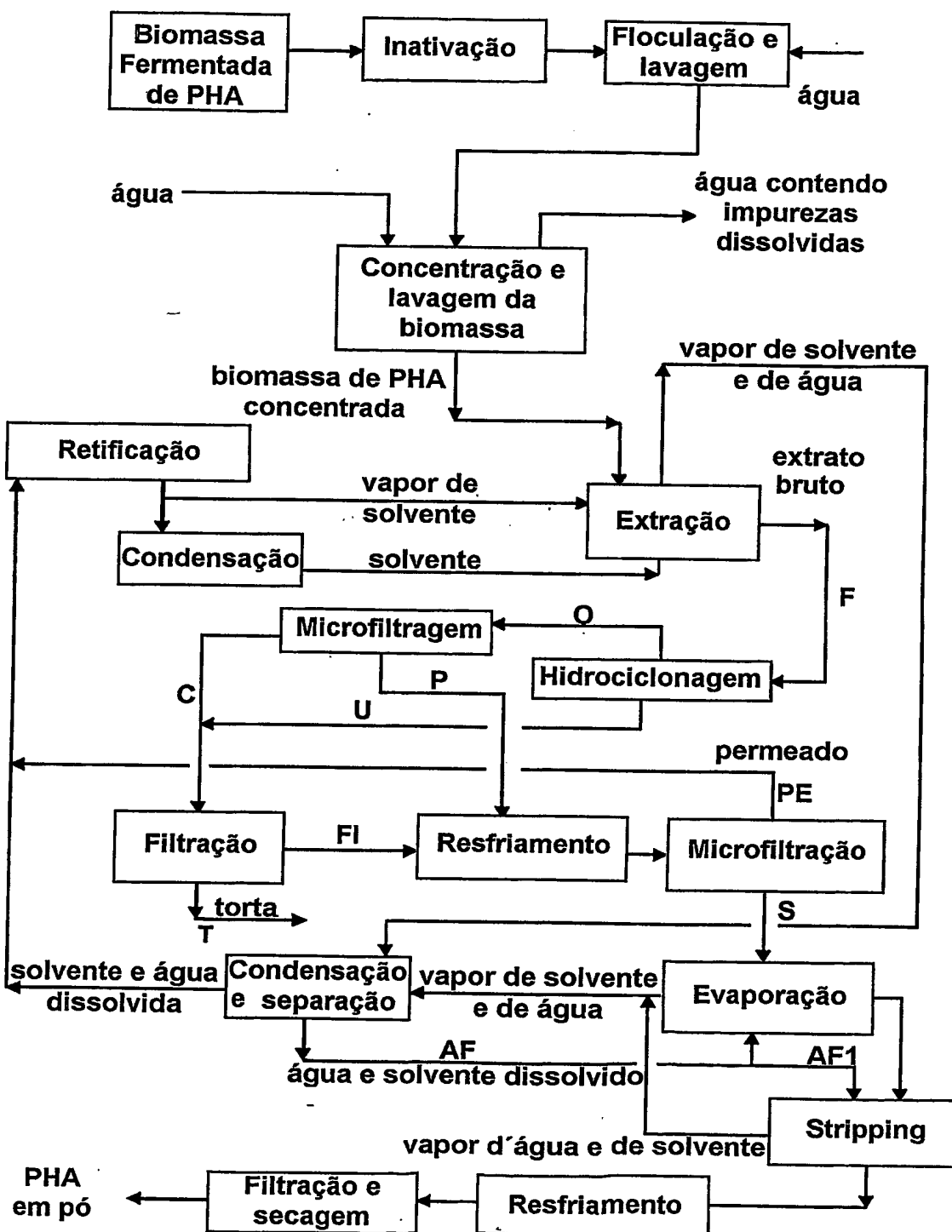
39- Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de compreender ainda a etapa final de secar as partículas de PHA separadas do meio aquoso do qual foi esgotado o solvente.

15 40- Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de os vapores de água e de solvente de PHA, gerados nas várias etapas do processo, serem condensados e separados em duas fases líquidas: uma fase líquida, rica em solvente que retorna ao processo  
20 na fase de extração e recuperação do PHA; e uma outra fase líquida pobre em solvente que é recirculada no processo para possibilitar a recuperação do solvente de PHA nela contido.

41- Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de as etapas de aquecimento da biomassa celular fermentada, de rompimento da parede das células da referida biomassa celular e de dissolução do PHA contido nessa última serem realizadas em um tempo total suficientemente curto para permitir a obtenção de  
25 PHA com peso molecular de, no mínimo, cerca de 850.000 Da, partindo-se de uma biomassa contendo PHA com peso molecular no mínimo de cerca de 1.000.000 Da.

42- Processo, de acordo com a reivindicação 41, caracterizado pelo fato de as etapas de separação e de  
35 resfriamento serem realizadas em um tempo suficientemente curto para permitir a obtenção de PHA com peso molecular de, no mínimo, cerca de 750.000 Da.

- 43- Processo, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de os grânulos de PHA obtidos na etapa (vi), após secagem, terem um tamanho médio de partículas na faixa de 40 a 400  $\mu\text{m}$  e, preferencialmente, na faixa de 100 a 200  $\mu\text{m}$ .
- 5 44- PHB, caracterizado pelo fato de ser produzido de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores.
- 62



RESUMO

"PROCESSO PARA RECUPERAÇÃO DE POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs) DE BIOMASSA CELULAR", a partir de uma biomassa bacteriana obtida por fermentação e na forma de um lodo de biomassa celular em suspensão aquosa, compreendendo as etapas de: submeter o lodo a operações de injeção de solvente de PHA, de agitação e de aquecimento, para formar uma suspensão compreendendo solvente de PHA com o PHA dissolvido, água e resíduos insolúveis; recuperar o solvente enriquecido com o PHA; resfriar rapidamente a solução de solvente de PHA, para precipitar o PHA dissolvido; micro-filtrar a suspensão de PHA precipitado no solvente, para separar uma pasta concentrada de PHA precipitado; lavar com água, aquecer e agitar a pasta de PHA concentrada, para prover a evaporação do solvente e a obtenção de uma suspensão contendo grânulos de PHA; agitar e cisalhar os grânulos de PHA e esgotar o solvente residual; e separar as partículas de PHA purificadas da suspensão.

64

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/BR04/000237

International filing date: 25 November 2004 (25.11.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: BR  
Number: PI 0405622-1  
Filing date: 19 November 2004 (19.11.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 February 2005 (21.02.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**